UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA DA AMAZÔNIA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM SORO DE CÃES DOMÉSTICOS E ANIMAIS SILVESTRES PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ

GIOVANNA ZANDONADI HABER

Belém/Pará
2025

GIOVANNA ZANDONADI HABER

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM SORO DE CÃES DOMÉSTICOS E ANIMAIS SILVESTRES PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em parceria com o Instituto Evandro Chagas (IEC), como requisito necessário para obtenção do título de mestra.

Linha de pesquisa: Fisiopatologia Humana e Experimental de Processos Infecciosos.

Orientadora: Profª. Drª. Patrícia Karla Santos Ramos

Coorientadora: Profª. Drª. Luciana do Rêgo Lima Queiroz

Belém/Pará

2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA

Haber, Giovanna Zandonadi

Diagnóstico molecular de infecção por *leishmania (leishmania) chagasi* em soro de cães domésticos e animais silvestres provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral no Estado do Pará / Giovanna Zandonadi Haber. – Belém: UEPA, 2025.

107f.: il.

Orientadora: Prof.ª. Dr. ª Patrícia Karla Santos

Coorientadora: prof.ª. Dr.ª. Luciana do Rêgo Lima Queiroz

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Biologia parasitária da Amazônia, Instituto Evandro Chagas, Belém, 2025.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Biologia Molecular. 3. Diagnóstico. I. Universidade do Estado do Pará. II. Instituto Evandro Chagas. III. Título.

CDD 22.ed. 616.9364

Elaborada por Josicléia Garcia Vieira - CRB-2 /562

GIOVANNA ZANDONADI HABER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia.

Data da avaliação: 27/06/2025
Conceito: _____

Orientação:

_____

Profª. Drª. Patrícia Karla Santos Ramos
(Universidade do Estado do Pará - UEPA
Instituto Evandro Chagas - IEC/SVSA/MS
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia - BioNorte)

_____

Dra. Luciana do Rêgo Lima Queiroz
(Instituto Evandro Chagas - IEC/SVSA/MS - Coorientadora)

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Júnior
(Universidade do Estado do Pará - UEPA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária – PPGBPA/UEPA
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVSA/MS)

_____

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi
(Universidade Federal do Pará - UFPA
Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica – PPGFARMABIO/UFPA)

_____

Prof. Dr. Samir Mansour Moraes Casseb
(Instituto Evandro Chagas - IEC/SVSA/MS
Programa de Pós-Graduação em Virologia - PPGV/IEC)

_____

Prof. Dr. Smayk Barbosa Sousa
(Universidade do Estado do Pará - UEPA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária – PPGBPA/UEPA – suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, ***Marcio Haber e Patricia Haber****, por serem a base da vida.*
Sem o amor, o esforço e a fé de vocês, nada disso teria sido possível.
Minha conquista é, acima de tudo, de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Nossa Senhora Auxiliadora e à Santa Luzia, minhas padroeiras, por guiarem e ampararem meus passos nos momentos mais difíceis. Estendo minha gratidão ao Senhor Jesus Cristo, a São José, ao Espírito Santo e a Deus, por sua constante proteção, força e luz nos períodos de fraqueza e incerteza.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Marcio Haber e Patricia Haber, meu maior alicerce. Sua dedicação, apoio incondicional e amor foram essenciais para que eu pudesse concluir esta etapa. Sem vocês, este mestrado não teria sido possível.

Agradeço, com carinho, às minhas cachorras Mel, Suzy Bae e, em memória, Branca, que trouxeram conforto, alegria e alívio em meio às dificuldades. Sou grata a Deus e à Nossa Senhora pela oportunidade de tê-las sob meus cuidados.

À minha família, agradeço aos meus avós Edna Zandonadi, José Emídio Zandonadi (*in memoriam*), Marlene Haber (*in memoriam*) e Rezalla Haber (*in memoriam*), por seus exemplos de força e sabedoria. Às minhas tias Alessandra, Paula, Juliana e Joana, e seus companheiros, por todo o apoio e presença. Aos meus primos-irmãos Maria Eduarda, Arthur e João Gabriel, minha eterna gratidão.

Agora eu gostaria de agradecer aos meus amigos, pessoas que fizeram parte do meu crescimento pessoal e me motivaram a seguir em frente em todas as fases da minha vida.

Aos amigos que me acompanharam ao longo da vida, meu sincero agradecimento. Em especial, à Sandy Aguiar, amiga e irmã de alma, pelo apoio constante, pelas conversas sérias verdadeiras e aconchegantes, e por todas as felicidades e por dividir esses últimos 10 anos de vida comigo. Ao Felipe Barros, pelas conversas sinceras, pelo carinho e pela dedicação que tem comigo, Lucas Gomes, pelas alegrias e pela gentileza que você proporciona e Adriel Nóbile, pelas risadas, pela ajuda, pelo apoio que tem me dado nos últimos anos. Obrigada pela presença na minha vida, a amizade e apoio são inestimáveis para mim. À Karen Mayna e Amanda Xavier, por mais de 18 anos de amizade, minha eterna admiração e carinho.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Karla Ramos, e a minha coorientadora, Profa. Dra. Luciana do Rêgo Lima Queiroz, por toda orientação, apoio e confiança ao longo desta trajetória. Sua dedicação foi fundamental para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas de laboratório e da ciência, Leila, Tainá, Railton, Erick e Davi, muito obrigada pela amizade, parceria e aprendizado. Aos amigos do mestrado, Mateus, Jonatan, Ana

Paula, Brenda, Iasmin, Bruna, João, Mayza e Davi e da pós-graduação em Estética, Ana Júlia, Greicy e Meg, sou grata pelo apoio e companheirismo.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, coordenador do Laboratório de Leishmaniose 'Prof. Dr. Ralph Lainson' (LLEISHRL-IEC), pela oportunidade concedida. Aos professores Dr. Bruno Tardelli Diniz Nunes, da Seção de Arboviroses (SEARB-IEC) e Dr. Edivaldo Costa Sousa Junior, da Seção de Parasitologia (SEPAR-IEC), pelas contribuições valiosas e apoio à minha pesquisa.

Agradeço aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Júnior, Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi, Prof. Dr. Samir Mansour Moraes Casseb e Prof. Dr. Smayk Barbosa Sousa, por sua disponibilidade, avaliação criteriosa e enriquecedora contribuição neste momento final.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC), ao LLEISHRL-IEC, às SEPAR e SEARB, e a todos os pesquisadores, técnicos, servidores e alunos, minha gratidão por integrarem este importante centro de pesquisa e proporcionarem um ambiente de aprendizado contínuo.

Agradeço à Universidade do Estado do Pará (UEPA), à Coordenação e à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), pelo apoio institucional, acadêmico e financeiro, bem como aos docentes e funcionários que sempre estiveram prontos a ajudar.

Por fim, agradeço à Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) e ao Governo do Estado do Pará, pela concessão da bolsa de mestrado, que foi essencial para a realização desta etapa da minha vida acadêmica.

EPÍGRAFE

“Eles só olham para os resultados e o sucesso
Cegos pelo nosso processo brilhante...
...Mostre a eles do que você é feito
Suas noites intermináveis merecem grandes aplausos
Brilhe intensamente e prove que eles estão errados
Porque podemos sentir nosso progresso
Brilhando, somos os campeões
Tentando fazer a diferença...”

Stray Kids – BLIND SPOT

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV), classificada como uma Doença Tropical Negligenciada, configura-se como um grave problema de saúde pública, intimamente associado à pobreza e às precárias condições sanitárias. Transmitida por flebotomíneos e tendo como hospedeiros vertebrados, além dos seres humanos, cães e animais silvestres, seu diagnóstico demanda a utilização de métodos laboratoriais precisos, essenciais para a realização de um tratamento eficaz. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo diagnosticar molecularmente a infecção por *Leishmania (L.) chagasi* em amostras de soro de cães e animais silvestres no estado do Pará, por meio da aplicação dos testes de ELISA -indireto-, para detecção de IgG, e da qPCR. Foram analisadas 85 amostras, sendo 60 provenientes de cães e 25 de animais silvestres, coletadas, tanto em áreas endêmicas (Barcarena/PA), quanto em áreas não endêmicas (Região Metropolitana de Belém/PA). O ELISA - indireto foi realizado utilizando antígenos previamente padronizados, enquanto, na qPCR, foram empregados *primers* e uma sonda, direcionados à região do kDNA do minicírculo do parasito. A padronização da extração de DNA e da qPCR foi bem-sucedida, com reprodutibilidade e limite de detecção (LOD) do ensaio em aproximadamente Cq=34. A concentração ideal de reagentes foi definida como 500 nM para *primers* e 200nM para a sonda e diluição do controle positivo foi de $1/10^6$. O ensaio demonstrou alta sensibilidade de 100%, eficiência de 110,4% e R^2 de 0,996. No entanto, foram observadas limitações na especificidade (2,17%) atribuídas à posição inadequada da sonda TaqMan®-MGB e à presença de SNPs, o que gerou reações cruzadas com o controle negativo e outras espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Além disso, a comparação com o ELISA-indireto revelou concordância quase nula entre os métodos, devido as diferenças metodológicas. Diante disso, foi desenvolvido um novo conjunto de oligonucleotídeos (conjunto GIO), com base na região do minicírculo do kDNA, visando maior especificidade. E apesar das limitações observadas quanto à especificidade, o método demonstrou potencial para detectar infecções mesmo em amostras com baixas cargas parasitárias, ressaltando, assim, a necessidade de aperfeiçoamento dos oligonucleotídeos empregados.

Palavras-chaves: Biologia Molecular. Diagnóstico. qPCR. Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL), classified as a neglected tropical disease, represents a serious public health concern closely linked to poverty and poor sanitary conditions. Transmitted by phlebotomine sandflies and having as vertebrate hosts not only humans but also dogs and wild animals, its diagnosis requires precise laboratory methods, which are essential for effective treatment. In this context, the present study aimed to molecularly diagnose *Leishmania (L.) chagasi* infection in serum samples from dogs and wild animals in the state of Pará, through the application of indirect ELISA for IgG detection and qPCR. A total of 85 samples were analyzed —60 from dogs and 25 from wild animals— collected from both endemic areas (Barcarena/PA) and non-endemic areas (Metropolitan Region of Belém/PA). The indirect ELISA was performed using previously standardized antigens, while in the qPCR assay, primers and a probe were used, targeting the kDNA minicircle region of the parasite. The standardization of DNA extraction and qPCR was successful, with good reproducibility and a limit of detection (LOD) at approximately Cq=34. The optimal reagent concentrations were established as 500nM for primers, 200nM for probe, and a $1/10^6$ dilution of the positive control. The assay demonstrated high sensitivity (100%), efficiency of 110.4%, and an R^2 value of 0.996. However, limitations in specificity (2.17%) were observed, attributed to the suboptimal positioning of the TaqMan®-MGB probe and the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs), which led to cross-reactions with the negative control and other *Leishmania* and *Trypanosoma* species. The comparison with the indirect ELISA revealed minimal agreement between the methods due to their methodological differences. In response to this, a new set of oligonucleotides (designated the GIO set) was developed, targeting the kDNA minicircle region to improve specificity. Despite the specificity limitations, the method showed potential to detect infections even in samples with low parasite loads, highlighting the need for further refinement of the oligonucleotides used.

Keywords: Molecular Biology. Diagnosis. qPCR. Visceral Leishmaniasis.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial de LV no mundo, no ano de 2023. 17
Figura 2 - Distribuição regional de LVA no Estado do Pará, no período de 2016-2019. 18
Figura 3 - Fêmea de Flebotomíneo adulto (foto ampliada). 22
Figura 4 - Ciclo de transmissão da LVA 23
Figura 5 - Modelo da curva de amplificação do PCR 32
Figura 6 - Gráfico representando o valor de C_T na amplificação por PCR. 33
Figura 7 - Representação de um curva de dissociação com *SYBR Green* 34
Figura 8 - Representação esquemática do funcionamento do sistema TaqMan® de detecção 35
Figura 9 - Desenho do estudo e atividades que foram realizadas. 38
Figura 10 - Mapa da localização das amostras de cães domésticos e animais silvestres. 39
Figura 11 – Gráfico de amplificação de qPCR do Teste Piloto - Fluorescência x Ciclos. 51
Figura 12 - Gráfico de amplificação de qPCR da matriz de primer - Fluorescência x Ciclos. 54
Figura 13 – Gráfico de amplificação de qPCR da matriz de sonda - Fluorescência x Ciclos. . 57
Figura 14 - Gráfico de amplificação de qPCR com diferentes diluições do controle positivo- Fluorescência x Ciclos. 60
Figura 15 - Curva padrão construída a partir de padrões de DNA do controle positivo - Cq x nanogramas. 60
Figura 16 - Gráfico de amplificação de qPCR do teste analítico de especificidade.- Fluorescência x Ciclos. 63
Figura 17 - Gráfico de amplificação de qPCR do teste de sensibilidade - Fluorescência x Ciclos. 67
Figura 18 – Gráfico de amplificação de qPCR do teste clínico de especificidade - Fluorescência x Ciclos 69
Figura 19 - Gráfico de amplificação de qPCR das amostras de animais silvestres - Fluorescência x Ciclos. 70
Figura 20 - Gráfico alinhamento de sequências de *L. (L.) chagasi* com os *primers* e a sonda. 73
Figura 21 - Análises secundárias (formação de hairpins) 75
Figura 22 - Estruturas secundárias (dímero de primer) 76
Figura 23 - Gráfico alinhamento de sequências de *L. (L.) chagasi* com os novos *primers* e a nova sonda. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de animais silvestres e doméstico 40
Tabela 2 - Cepas de *L. (L.) chagasi* provenientes do criobanco do laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson” 41
Tabela 3 - Cepas usadas no teste de especificidade provenientes do criobanco do laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”..... 43
Tabela 4 - Amplificação do teste de viabilidade de primers e sonda. 52
Tabela 5 - Amplificação de qPCR da matriz de primer 55
Tabela 6 - Resultados Matriz de Sonda 58
Tabela 7 - Curva de diluição do controle positivo..... 61
Tabela 8 - Teste analítico de especificidade da reação de qPCR. 64
Tabela 9 - Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres pelo ELISA-indireto (IgG) 66
Tabela 10 – Alinhamento das sequências de *primers* e da sonda..... 72
Tabela 11 – Análises Físico-químicas das sequencias dos *Primers e* das Sonda de qPCR 74
Tabela 12 - Alinhamento das sequências dos novos *primers* e sonda..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

BBA	Binding Buffer (Tampão de ligação)
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEPAN/IEC	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas
CEUA/IEC	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas
CI	Controles Internos
CLD	Cell Lysis Buffer (Tampão de quebra celular)
CN	Controle Negativo
Cq	Ciclo de Quantificação
CP	Controle Positivo
C_t	Ciclo Threshold
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV	Coeficiente de Variação
CWD	Column Wash Solution (Solução de lavagem)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Deoxinucleotídeos Trifosfatados
Dpcr	Reação em Cadeia da Polimerase Digital
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAPESPA	Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas
GC	Guanina-Citocina
gDNA	DNA Genômico
H_2O	Água
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDNA	DNA do cinetoplasto
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LIT	Liver Infusion Triptose
LLEISHRL	Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”
LOD	Limite de detecção
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral

LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M	Molar
MGB	Minor Groove Binder
mim	Minutos
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
MS	Ministério da Saúde
mm	Milímetro
mL	Mililitro
NESTED-PCR	Reação em cadeia da polimerase aninhada
ng	Nanogramas
nM	Nanometro
NNN	Novy-Nicolle-McNeal
NTC	Controle sem Template
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Solução Tamponada de Salina Fosfatada
PBS-T	PBS Tween 20
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPP-SIGMA	p-Nitrophenyl Phosphat (Substrato Cromógeno)
PPGBPA	Pós- Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia
PPGFARMABIO	Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica
PPGV/IEC	Pós-Graduação em Virologia
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
R^2	Coeficiente de Correlação
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotação por Minuto
RIM	Reação Intradérmica de Montenegro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
seg	Segundos
SEPAR	Seção de Parasitologia

SEARB	Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
SUS	Sistema Único de Saúde
Tm	Temperatura de melting
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
USA	United States of America
vs	Versus
VPP	Valor Preditivo Positivo
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
ºC	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
=	Igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA 16
1.1.1. Fatores interferentes na epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana 19
1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA 20
1.2.1. Agente Etiológico 21
1.2.2. Flebotomíneo e o ciclo de transmissão 22
1.2.3. Hospedeiros 25
1.3. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL 26
1.3.1. Parasitológico 27
1.3.2. Sorológico 28
1.3.3. Ensaio de método molecular 29
2. OBJETIVOS 37
2.1. OBJETIVO GERAL 37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37
3. METODOLOGIA 38
3.1. DESENHO DO ESTUDO 38
3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS 39
3.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA INDIRETO 41
3.4. CULTIVO DE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* SP 42
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE SORO A PARTIR DE AMOSTRAS DE CÃES E ANIMAIS SILVESTRES 43
3.6. QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA EXTRAÍDAS 43
3.7. TESTES DE PCR EM TEMPO REAL PARA VALIDAÇÃO DO DIAGNÓSTICO COM SORO 43
3.7.1. Teste de Viabilidade dos Iniciadores e Sonda 43
3.7.2. Otimização das condições ideais de reação 44
3.7.3. Avaliação da Eficiência da Reação 45
3.7.4. Avaliação da Especificidade da Reação 45
3.7.5. Avaliação dos Limites de Detecção 45
3.7.6. Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres por qPCR 46
3.7.7. Análise de estruturas moleculares *primers* e sondas 47
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 48
3.9. ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA 49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
4.1. VIABILIDADE DOS INICIADORES, SONDA de qPCR 50

4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE REAÇÃO DA qPCR 53
4.3. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO de qPCR 62
4.4. AVALIAÇÃO DOS SOROS DE CÃES DOMÉSTICOS E ANIMAIS SILVESTRES - LIMITES DE DETECÇÃO 65
4.4.1. Ensaio Imunoenzimático - ELISA Indireto 65
4.4.2. Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres pelo método molecular (qPCR) 66
4.5. ANÁLISE *in silico* DA SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* E DAS SONDAS 71
4.5.1. Análise *in sílico* dos novos primers e sonda de qPCR 77
5. CONCLUSÃO 80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
ANEXO A 102
ANEXO B 103
ANEXO C 104
ANEXO D 106

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

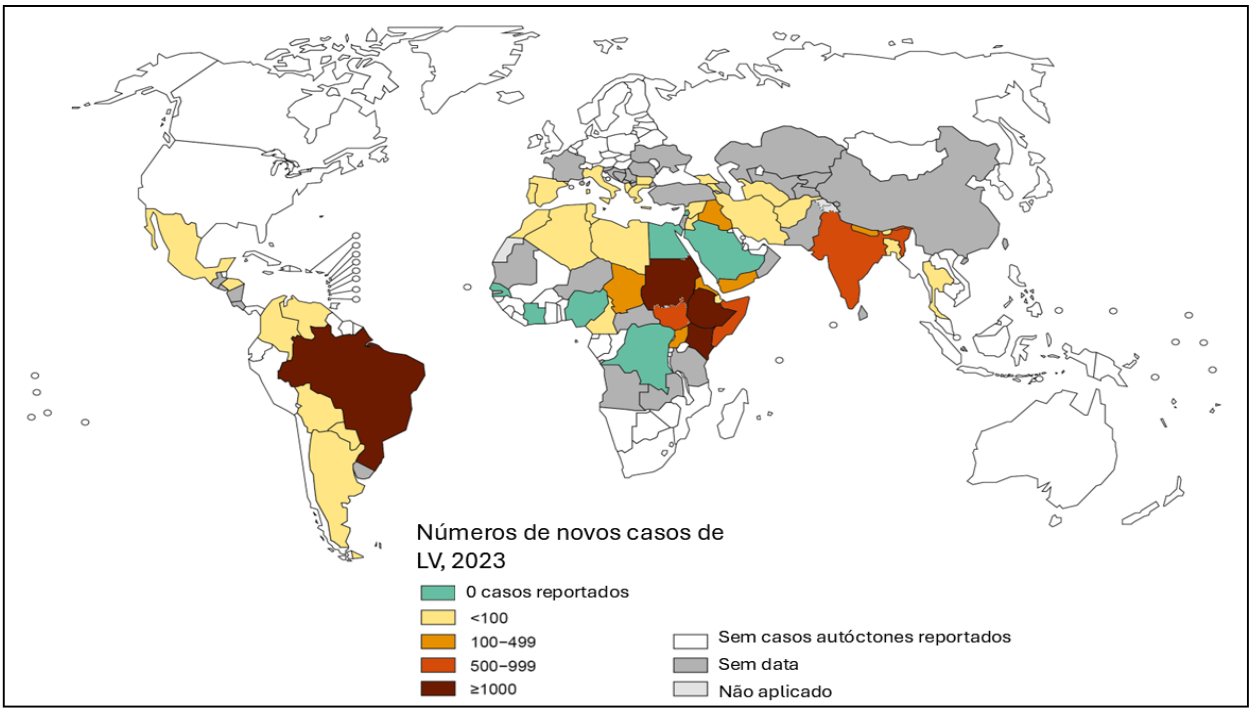
As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) compõem um conjunto diversificado de condições ocasionadas por diversos agentes patogênicos, que incluem vírus, bactérias, parasitas, fungos e toxinas, acarretando graves repercussões para a saúde, bem como implicações sociais e econômicas devastadoras. A complexidade epidemiológica das DTNs frequentemente está associada às condições ambientais precárias, onde a disponibilidade limitada de saneamento adequado, água potável e assistência médica influencia significativamente sua propagação (PAHO, 2024; WHO, 2024a).

Muitos desses patógenos relacionados às DTNs são disseminados por vetores, encontram-se em reservatórios animais e estão inseridos em ciclos de vida intricados, o que torna desafiadora a tarefa de controlá-los em termos de saúde pública. As DTNs têm um impacto desproporcional sobre as comunidades mais desfavorecidas e marginalizadas em várias regiões do globo, especialmente na África, Ásia e Américas. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas sejam afetadas pelas DTNs, enquanto aproximadamente 1,6 bilhão necessitam de intervenções para lidar com essas condições, seja através de medidas preventivas ou tratamento (PAHO, 2024; WHO, 2024a).

Entre o grupo das DTNs, a Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar, está incluída como uma doença de grande importância para a saúde pública, devido à considerável expansão geográfica, à elevada incidência e às altas taxas de mortalidade. Por esses motivos, hoje a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluiu entre as seis doenças consideradas prioritárias no programa de controle da referida instituição (WHO, 2024b).

As leishmanioses são consideradas entre as principais endemias no mundo, de alta gravidade e mortalidade afetando os humanos. Ela é uma doença crônica grave causada por espécies do gênero Leishmania (LAINSON *et al.*, 1987).

Figura 1 - Distribuição mundial de LV no mundo, no ano de 2023.



Fonte: Adaptado de WHO, 2024

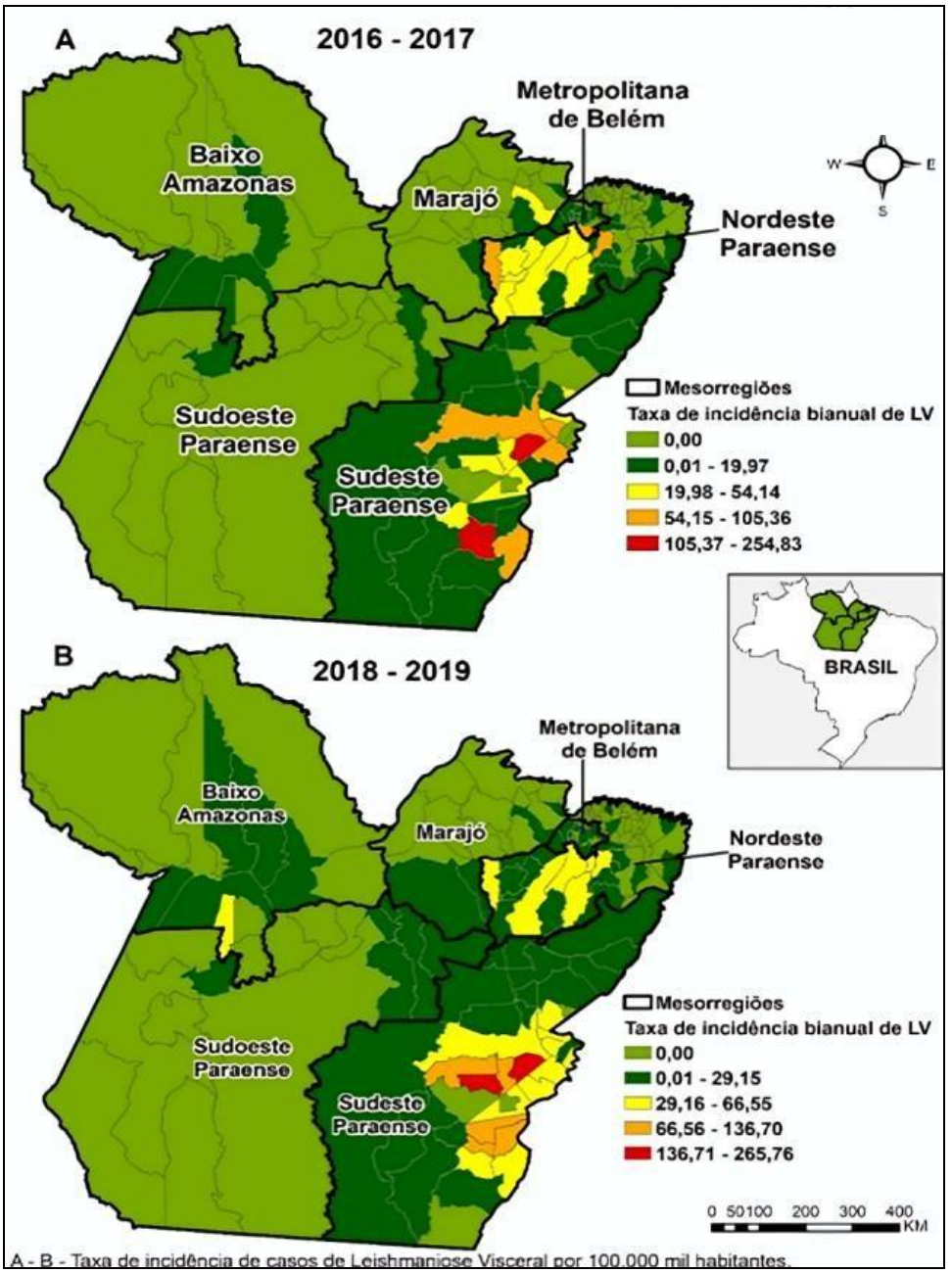
Segundo a OMS, a doença pode conduzir mais de 90% dos pacientes a óbito em até dois anos em casos sintomáticos graves, se não forem submetidos à terapia específica. A LV apresenta ampla distribuição mundial, sendo considerada endêmica em 80 países. Dentre estes, em torno de 68% dos casos ocorre nos países: Brasil, Índia, Quênia e Sudão (Figura 1). Nas Américas, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ocorre desde o México até a Argentina, sendo endêmica em 13 países (PAHO, 2023; WHO, 2022).

Atualmente, o Brasil é responsável por reportar aproximadamente 94% de novos casos nas Américas, sendo o país com maior taxa de letalidade. A LVA está amplamente distribuída no Brasil, tendo sido notificada em 24 das 27 Unidades da Federação, atingindo todas as regiões geográficas, com maior número de casos reportados nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte (PAHO, 2023; SINAN SVS, 2022).

Segundo o Ministério da Saúde foram confirmados 7.243 casos novos de LVA no Brasil, sendo a região Nordeste responsável pelo maior registro de casos do país (55,37%) (SAÚDE, 2025).

No Pará, a situação da LVA é das mais preocupantes em todo o país, já que, atualmente, o estado ostenta uma das maiores casuísticas da doença, com 573 novos casos no período de 2020-2024 (SAÚDE, 2025).

Figura 2 - Distribuição regional de LVA no Estado do Pará, no período de 2016-2019.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2022.

Os municípios paraenses como Barcarena, que pertence a região metropolitana de Belém já apresentou alta prevalência (37,2%) da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, (PEREIRA, *et al.,* 2006). Outro estudo que avaliou a prevalência da infecção por *L. (L). chagasi* em cães neste mesmo município, e considerou a reatividade de dois métodos imunológicos, a RIFI (IgG) e o reação intradérmica de Montenegro (RIM) revelou concomitantemente uma taxa de prevalência de 43% (SILVEIRA *et al.,* 2012). Além de

Barcarena, outros municípios da região sudeste do Estado do Pará, em destaque Marabá, Parauapebas, Canaã dos Carajás e Curionópolis, aparecem com os maiores índices de estratificação de risco para a LVA no período de 2016 a 2019 (Figura 2) (SILVA *et al.*, 2022). Sendo essas cidades responsáveis por 31,06% (178) dos novos casos no estado do Pará, nos períodos de 2020-2024 (SAÚDE, 2025).

1.1.1. Fatores interferentes na epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana

A LVA passou por processo de urbanização, que pode ser correlacionado a intervenções na cadeia epidemiológica, envolvendo parasito, vetores e hospedeiros (FURTADO *et al.*, 2022; WHO, 2024b).

Dentre essas intervenções, destacam-se a pobreza, a má nutrição, o descaso, a discriminação, os processos migratórios e as modificações ambientais causadas por ações antrópicas, que estão ligadas ao rápido processo migratório em áreas periurbanas (desmatamento e urbanização); a adaptação do vetor, flebotomíneo, ao peridomicílio com eclética preferência alimentar; e a interação e mobilização de reservatórios infectados para áreas sem transmissão (FILIPE DANTAS-TORRES *et al.*, 2019; FURTADO *et al.*, 2022; SILVEIRA *et al.,* 2013).

A caracterização das leishmanioses como um grupo de doenças em que o meio ambiente exerce um papel importante em sua incidência pode estar relacionada ao desequilíbrio ambiental, resultante do contato do homem com ambientes quentes e úmidos das florestas tropicais e subtropicais, atribuindo à doença característica de antropozoonose, dividindo papel de reservatório entre animais silvestres e domésticos (CARVALHO *et al.*, 2020).

Os fatores que compõe a epidemiologia desta doença são diversos, dependentes da região geográfica e fatores socioculturais da população local, o que impossibilita o estabelecimento de padrões epidemiológicos e ecológicos comuns para diversas regiões, dificultando medidas de controle da doença. A identificação do agente etiológico circulante nas áreas endêmicas, o conhecimento dessas áreas, bem como o papel dos hospedeiros-reservatórios, são agentes importantes para definição de medidas profiláticas da doença (SILVEIRA *et al.*, 2016).

No Novo Mundo, a *L. (L.) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LVA (LAINSON, 2010; MANN *et al.*, 2021). Além disso, tem o cão doméstico (*Canis familiaris*) como principal fonte de infecção ao homem (LIMA *et al.*, 2010). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do

que no homem (FURTADO *et al.*, 2022; PARKER *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2010). O cão tem sido incriminado como responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, devido à alta prevalência da doença nesses animais, ao elevado parasitismo na pele e a íntima relação com o ser humano (FILIPE DANTAS-TORRES *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2010; MANN *et al.*, 2021; TRAVI *et al.*, 2018). A LVA também tem como reservatório animais silvestres como, a exemplo de raposas (*Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis sp*) (BENCHIMOL, 2020).

A presença de animais domésticos e silvestres representa importante indicativo epidemiológico da circulação do agente etiológico da LVA tanto em ambientes rurais quanto urbanos (BITENCOURT; BEZERRA, 2022; FARIA; ANDRADE, 2012; MOTTA; EBERT; BATISTA, 2021; NETO, 2006; SILVA, 2007; VIEIRA; FIGUEIREDO, 2021). Do ponto vista epidemiológico, a infecção canina é mais prevalente que a humana, o que demonstra a sua importância na saúde pública (FURTADO *et al.*, 2022; LAURENTI *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2016).

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma antropozoonose que afeta tanto humanos quanto canídeos, sejam eles domésticos ou silvestres. Esta doença representa um dos principais desafios de saúde pública no Brasil, sendo considerada endêmica devido à persistência da sua ocorrência em todo o território nacional, conforme indicado pelos relatórios de notificação (SAÚDE, 2021).

Por esse e outros motivos, a LVA é considerada uma doença crônica grave. Sua etiologia está ligada a espécies do gênero *Leishmania* (LAINSON *et al.*, 1987). É notável que a maioria dos indivíduos infectados não manifesta a doença clinicamente, apresentando formas subclínicas que podem permanecer assintomáticas ou assumir uma forma oligoassintomática, caracterizada por febre intermitente e irregular, perda de peso, pancitopenia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia, linfoadenopatia, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados evoluem para a forma clássica da doença, exibindo fraqueza geral, caquexia e eventual óbito (BADARO *et al.*, 1986a; BRASIL, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2010).

Além disso, esse parasito, *L. (L). chagasi,* tem o potencial de afetar órgãos internos, como baço, fígado e medula óssea. Em seres humanos, a infecção pode se manifestar de maneira sistêmica em indivíduos com susceptibilidade imunológica, manifestando-se com sintomas

como febre, perda de peso e aumento do baço ou fígado (BRASIL, 2014; MANN *et al.*, 2021; PASTORINO *et al.*, 2002). Casos graves, se não diagnosticados e tratados precocemente, frequentemente resultam em fatalidade (SILVEIRA *et al.*, 2016).

A LVA em animais, mais especificamente em cães, trata-se de uma enfermidade sistêmica grave cujas manifestações clínicas são fortemente influenciadas pelo tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães afetados abrange uma ampla gama de características, que podem variar desde uma aparência de saúde aparente até estágios finais graves da doença (FILIPE DANTAS-TORRES *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2021).

1.2.1. Agente Etiológico

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (LAISON *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2023).

Existem numerosas espécies de Leishmanias, que são classificadas em dois subgêneros principais: Leishmania e Viannia. No subgênero Leishmania, os protozoários têm uma propensão ao crescimento em cultura, induzem a formação de grandes lesões nodulares em hamsters e se reproduzem principalmente no intestino médio e anterior do vetor. Por outro lado, os parasitos pertencentes ao subgênero Viannia tendem a ter um crescimento mais limitado em meio de cultura e desenvolvimento mais lento em hamsters experimentalmente infectados, preferencialmente alojando-se no intestino posterior do vetor (LAINSON *et al.*, 1987; WHO, 2024b).

A LVA é causada por espécies de Leishmania pertencentes ao complexo Donovani, que inclui: Laveran & Mesnil 1903, *L. (L.) infantum*, Nicolle 1908 e *L. (L). chagasi*, Lainson & Shaw 1987 *(= L. chagasi*, Cunha e Chagas 1937) (CHAGAS *et al.*, 1938; NOVY, 1908; ROSS, 1903; SILVEIRA *et al.*, 2023).

A origem e a classificação taxonômica da *L. (L.) chagasi* têm sido objeto de debate em estudos anteriores (SHAW, 2006). A sua identificação foi contestada em 1999 com base nos resultados de um estudo conduzido por (MAURICIO *et al.* (1999). O agente causal da LVA no Novo Mundo foi previamente identificado como *L. (L). chagasi*. Após o desenvolvimento da caracterização molecular, no entanto, as comparações entre *L. (L). chagasi* e *L. (L.) infantum* mostraram alta similaridade, sendo então *L. (L). chagasi* considerado sinônimo de *L. (L.) infantum* (LAINSON; RANGEL, 2005; SALOMÓN; ORELLANO, 2005; SILVEIRA *et al.*,

2023; ZELEDÓN; MURILLO; GUTIERREZ, 1984).

Dessa forma, atualmente considera-se o agente causal da LVA é a espécie *L. (L.) chagasi* (SILVEIRA *et al.*, 2021, 2023).

1.2.2. Flebotomíneo e o ciclo de transmissão

Os transmissores da LVA são insetos conhecidos como flebotomíneos, popularmente chamados de mosquito-palha, mosca de areia, tatuquiras, biriguis, entre outros. No Brasil, a doença é naturalmente transmitida pela picada de fêmeas do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2014; GALATI, 2003). Até o momento, duas espécies estão associadas à transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia cruzii* Deane & Deane, 1954 (LAINSON; RANGEL, 2005; LUTZ; NEIVA, 1912).

A primeira é considerada a principal vetor da *L. (L.) chagasi*, com uma ampla distribuição geográfica e indícios de expansão, logo, encontrado em quatro das cinco regiões geográficas do Brasil: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2014). Por outro lado, o *Lutzomyia cruzii* foi identificado como vetor em áreas específicas como Corumbá, Ladário e Jaciara, no estado do Mato Grosso do Sul (DOS SANTOS *et al.*, 1998).

Figura 3 - Fêmea de Flebotomíneo adulto (foto ampliada).



Fonte: Adaptado www.pereirabarreto.sp.gov.br, 2024.

Esses insetos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pelos e são de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e posar com as asas entreabertas (Figura 3) (FORATTINI, 1973; RANGEL; LAINSON, 2003).

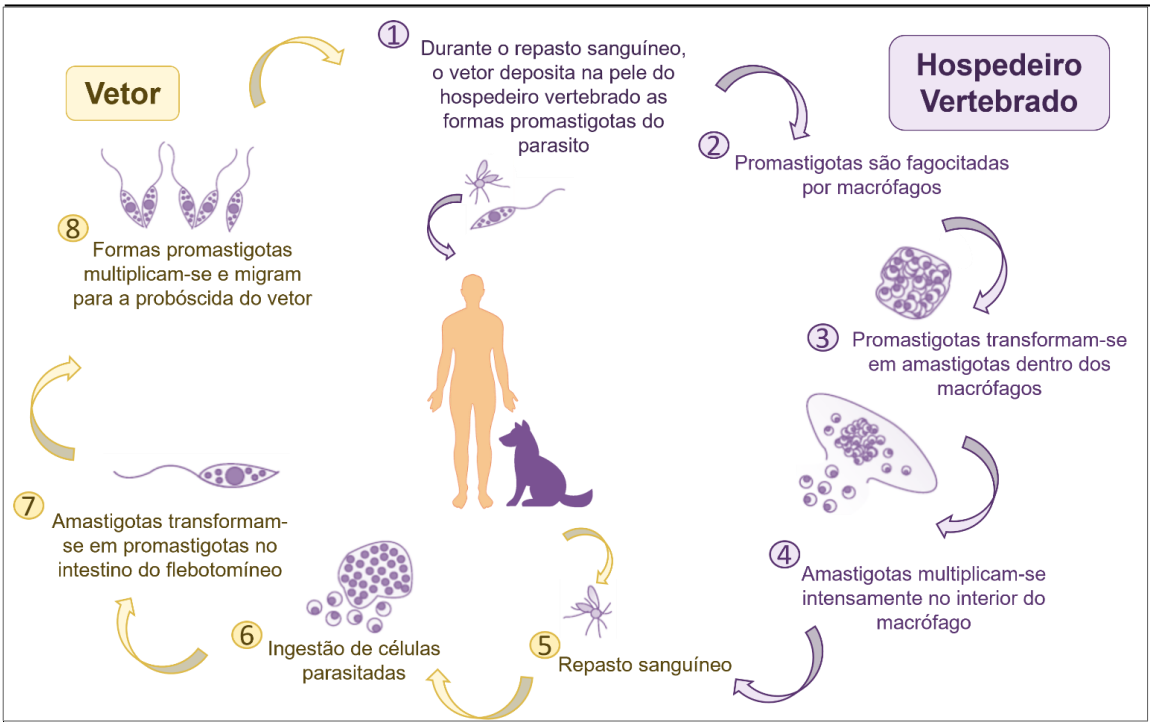
O *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais

domésticos (LAINSON; RANGEL, 2005; LUZ *et al.*, 2001; SALOMON, 2021). Há indício de que o período de maior transmissão da LVA ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2014).

As fêmeas são hematófagas obrigatórias, exibindo hábitos ecléticos ao se alimentarem do sangue de diversas espécies de animais vertebrados, incluindo seres humanos. A atividade dos flebotomíneos ocorre principalmente durante o crepúsculo e à noite dentro e ao redor de residências (CAMPOS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014). O *L. longipalpis* é frequentemente encontrado próximo a fontes de alimento (LAINSON; RANGEL, 2005; LAINSON; WARD; SHAW, 1977). Durante o dia, esses insetos permanecem em repouso, abrigados em locais sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (RANGEL; LAINSON, 2003).

Além da transmissão vetorial, outras formas de disseminação também têm sido investigadas, como transfusional (URIAS *et al.*, 2009), congênita (ZINCHUK; NADRAGA, 2010) e por meio de transplantes de órgãos (ANTINORI *et al.*, 2008).

Figura 4 - Ciclo de transmissão da LVA



Fonte: Adaptado de REITHINGER; DUJARDIN, 2007.

A transmissão dos parasitos ocorre em um ciclo digenético (heteroxênico), envolvendo uma alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura 4). Durante esse

processo, os parasitos passam por significativas mudanças morfológicas em seu ciclo de vida, apresentando diferentes estágios em regiões distintas dentro de seus hospedeiros e vetores. Ao longo do ciclo de vida, os parasitos exibem duas morfologias principais: a amastigota intracelular, presente nos hospedeiros vertebrados, e a promastigota, encontrada nos insetos vetores (HOMMEL, 1978; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

A amastigota é caracterizada por sua forma esférica, ausência de flagelo livre, com dimensões variando entre 2 a 5 μm, e é encontrada no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados, onde se replica. Enquanto isso, a promastigota apresenta uma forma alongada, com flagelo livre, e dimensões variando entre 15 a 35 μm. Essa forma é encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, onde realiza o processo de reprodução (LAINSON *et al.*, 1987).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, durante a alimentação sanguínea em mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da Leishmania. No trato digestivo anterior do vetor, ocorre a ruptura dos macrófagos, liberando essas formas parasitárias. As formas amastigotas se reproduzem por divisão binária e rapidamente se diferenciam em formas flageladas conhecidas como promastigotas. Estas, por sua vez, também se reproduzem através de divisões binárias sucessivas, que colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo. Nesse estágio, elas se diferenciam em formas infectantes conhecidas como promastigotas metacíclicas ciclo do parasito no inseto é completado em aproximadamente 72 horas (Figura 4) (HOMMEL, 1978; KILLICK-KENDRICK, 1990; RÊGO; SOARES, 2021; SALOMON, 2021; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011). Após esse período, as fêmeas infectantes, ao realizar uma nova alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva do inseto. Na pele do hospedeiro, essas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Dentro dos macrófagos, elas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam vigorosamente até o rompimento deles, resultando na liberação dessas formas, que serão então fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Isso leva à disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (KAYE; SCOTT, 2011; PIMENTA *et al.*, 1997; RÊGO; SOARES, 2021; SALOMON, 2021; WALTERS, 1993).

1.2.3. Hospedeiros

Além de ser encontradas em humanos (LAINSON, 2010; MANN *et al.*, 2021), também impacta uma variedade de mamíferos, incluindo tanto espécies silvestres quanto domésticas, que coabitam com os humanos. Estas englobam uma gama diversificada de animais, como canídeos, felinos, equídeos, marsupiais, quirópteros, roedores, entre outros (GÓMEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; MENDONÇA *et al.*, 2020). No entanto, nem todas essas espécies desempenham um papel como fontes de infecção para os vetores e na amplificação de focos enzoóticos. Portanto, são necessários estudos adicionais para compreender os sistemas reservatórios e o papel específico desempenhado por cada espécie de mamífero na manutenção dos parasitos na natureza (ROQUE; JANSEN, 2014).

Dentre os mamíferos mencionados, o papel do cão doméstico (*Canis familiaris*) é bem estabelecido e amplamente reconhecido. Os cães são considerados eficientes reservatórios de *L. (L.) chagasi* (LIMA *et al.*, 2010), devido à sua alta suscetibilidade à infecção, à sua convivência próxima com os seres humanos, o que favorece a manutenção do ciclo de transmissão doméstico, e ao intenso parasitismo cutâneo (BORJA *et al.*, 2016).

A prevalência de infecção por *L. (L.) chagasi* é frequentemente alta em cães em áreas endêmicas de LVA, com uma proporção significativa de cães assintomáticos (LIMA *et al.*, 2010; PARKER *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2016). Além disso, os cães podem permanecer infectados pelo parasito sem apresentar sinais clínicos evidentes de LVA por anos, até mesmo por toda a vida, e ainda serem capazes de transmitir o parasito (LAURENTI *et al.*, 2013).

Algumas outras espécies de mamíferos silvestres são consideradas potenciais reservatórios de LVA nas Américas. Entre elas, destacam-se os marsupiais, como os gambás, representados por espécies dos gêneros *Didelphis* sp*, Marmosa* sp*, Caluromys* sp*, Philander* sp *e Nasua* sp (LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019; MOTTA; EBERT; BATISTA, 2021; PARKER *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2016). Além disso, existem espécies de pequenos roedores como: *Necromys* sp*, Proechimys* sp *e Oxmycteryus* sp (FONSECA JÚNIOR *et al.*, 2021; RATZLAFF *et al.*, 2023; SAPATERA, 2022; SILVA; SILVA; CAMPOS, 2021).

Por fim, o cachorro-do-mato, raposa ou lobinho (*Cerdocyon thous*), foi identificado como a primeira espécie de carnívoro silvestre a ser infectada com *L. (L.) chagasi* (LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019; SANTOS, 2024; SAPATERA, 2022; SILVA; SILVA; CAMPOS, 2021; SILVEIRA *et al.*, 1982). Esta espécie de canídeo pode apresentar prevalências de infecção de até 78% por sorologia e de até 42% por isolamento de cultura (COURTENAY *et*

al., 2002; LAINSON *et al.*, 1990).

Portanto, limitar a responsabilidade exclusiva dos cães na manutenção da endemia de LVA pode reduzir as chances de sucesso no controle epidemiológico, dado que outros mamíferos também podem atuar como possíveis reservatórios (FERREIRA *et al.*, 2018). É importante destacar que a condição de reservatório é dinâmica, variando em diferentes ambientes e ao longo do tempo, e apenas estudos locais da enzootia podem determinar a participação ou não de determinadas espécies como potenciais reservatórios (CAROLINE *et al.*, 2023; LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019; SAPATERA, 2022).

As estratégias de controle da LVA devem ser específicas conforme a situação epidemiológica de cada local. A identificação do agente etiológico circulante nas áreas endêmicas, o conhecimento dessas áreas, bem como o papel dos hospedeiros-reservatórios, são fatores importantes para definição de medidas profiláticas para a redução da incidência da doença, tais como: 1) diagnóstico e tratamento precoce dos doentes; 2) combate ao vetor; e 3) diagnóstico laboratorial e eliminação do reservatório doméstico (LIMA *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2016).

1.3. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico da LVA se baseia em três esferas: clínico, epidemiológico e laboratorial. Alguns métodos de diagnóstico laboratorial vêm sendo utilizados, tais como: os métodos parasitológicos, os métodos sorológicos, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e os métodos moleculares, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional e em Tempo Real (qPCR) (COSTA *et al.*, 2021; GALLETTI *et al.*, 2011).

No caso de suspeita de infecção no homem são utilizadas as seguintes metodologias de acordo com o manual de leishmaniose visceral do Ministério da Saúde (MS): a) Parasitológico direto (punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasita - porém apresenta restrições quanto ao procedimento por ser muito invasivo e necessitar de um médico habilitado para o procedimento, bem como, aporte de um hospital (CARNEIRO *et al.*, 2023; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

b) isolamento em meio de cultura *(in vitro*) e c) isolamento em animais susceptíveis (*in vivo*). Para reduzir riscos, usam-se rotineiramente métodos sorológicos menos invasivos como RIFI e ELISA, utilizando apenas o soro do paciente. E para o diagnóstico laboratorial da doença

canina, é feito de forma semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado principalmente nos exames sorológicos ou moleculares (CARNEIRO *et al.*, 2023; MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

1.3.1. Parasitológico

O método parasitológico é amplamente considerado o método de referência para LVA, baseando-se na identificação direta do parasito e seu isolamento em cultura (WHO, 2010). As formas amastigotas de Leishmania spp. podem ser observadas por meio de exame direto após a coloração (com Giemsa ou Leishman) de tecidos do baço, medula óssea, fígado e linfonodos (DAVIES *et al.*, 2003).

O material obtido por aspiração da medula óssea, baço ou de outros tecidos pode ser inoculado em meios de cultura axênicos, nos quais as formas promastigotas do parasito podem ser subsequentemente observadas. O meio mais comumente empregado para esse propósito é o Novy-Nicolle-McNeal (NNN), frequentemente complementado com outros meios como o Liver Infusion Triptose (LIT), o Schneider ou RPMI 1640 (SHERLOCK, 1996). As culturas devem ser mantidas a uma temperatura entre 24 e 26°C e examinadas semanalmente ao microscópio, ao longo de um período de quatro semanas (BRASIL, 2014).

O crescimento dos parasitos em cultura pode aumentar a sensibilidade da pesquisa, porém, pode também atrasar o diagnóstico em semanas. Embora raramente necessário na prática clínica, o cultivo de *Leishmania* sp. é indicado como uma complementação à abordagem diagnóstica, especialmente em casos de falhas nas metodologias convencionais ou para possibilitar o isolamento e a caracterização da espécie. Além disso, o isolamento dos parasitos é benéfico para obter material para a produção de antígenos e realizar triagens de drogas (ARONSON *et al.*, 2016; SUNDAR; RAI, 2002).

O isolamento de parasitos em *hamsters* demonstra uma sensibilidade acima de 90%, porém, pode demandar meses para estabelecer um diagnóstico definitivo e requer uma infraestrutura complexa (BROWN, 2009). A infecção do animal pode ocorrer por diversas vias, sendo a via intraperitoneal a mais comumente empregada. O animal deve ser examinado semanalmente em busca de sinais da doença e, se positivo, os parasitos podem ser isolados em cultura, por meio de fragmentos de tecidos (biópsias) esplênicas e hepáticas (SUNDAR; RAI, 2002).

1.3.2. Sorológico

O emprego de técnicas imunológicas na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* é amplamente difundido, em grande parte devido a uma das características proeminentes da LVA, que é a presença de hipergamaglobulinemia, ou seja, aumento dos níveis de imunoglobulinas (anticorpos) no sangue. As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da LVA incluem a RIFI e o ELISA (BADARO *et al.*, 1986b; FREIRE *et al.*, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

1.3.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Desde 1964 (DUXBURY; SADUN, 1964), a RIFI tem sido amplamente empregada no diagnóstico da LVA, sendo atualmente o teste disponibilizado pelo sistema de saúde brasileiro (BRASIL, 2014). Essa técnica envolve a fixação de antígenos Leishmania em lâminas de microscopia para fluorescência, onde ocorre a reação com o soro a ser testado. Após a reação, a ligação antígeno-anticorpo é visualizada com conjugado fluorescente, e os resultados da imunofluorescência são expressos em diluições, considerando-se reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:80. (FREIRE *et al.*, 2019; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019; VIEIRA *et al.*, 2017).

De modo geral, sensibilidade variando de 61 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% têm sido descritas para a RIFI, o que depende da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizada (ARAUJO; MAYRINK, 1968; BADARO; REED; CARVALHO, 1983; CAÑAVATE *et al.*, 2011; KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020).

1.3.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os métodos imunoenzimáticos têm sido empregados desde 1971 para detectar anticorpos específicos contra o parasito, sendo que seu desempenho é diretamente influenciado pelo tipo de antígeno utilizado (HO *et al.*, 1983). Embora esses métodos sejam bastante produtivos, sua realização requer infraestrutura laboratorial e profissionais especializados, além de envolver várias etapas de incubação e demandar um tempo considerável. Os critérios para determinar positividade dependem dos pontos de corte (*cut-off*), os quais devem ser estabelecidos para cada teste.

A falta de especificidade é uma desvantagem comum em métodos que utilizam antígenos não purificados, devido à reatividade cruzada. Para enfrentar esse problema, alguns antígenos purificados recombinantes têm sido identificados e subsequentemente avaliados por ELISA (MAALEJ *et al.*, 2003). Entre esses, a proteína recombinante K39, uma sequência de 39 aminoácidos clonada e derivada do DNA encontrado no cinetoplasto da *L (L). chagasi*, específica do complexo *donovani*, tem sido amplamente estudada (BURNS *et al.*, 1993).

De modo geral, a sensibilidade do ELISA utilizando o antígeno bruto de Leishmania spp. varia de 36 a 100%, enquanto a especificidade varia de 62,5 a 100% (HARITH *et al.*, 1987; MAALEJ *et al.*, 2003; MANDAL *et al.*, 2008). Por outro lado, o ELISA utilizando o antígeno rK39 demonstra sensibilidade variando de 93 a 100% e especificidade variando de 84 a 100% (DE ASSIS *et al.*, 2009; VAISH *et al.*, 2012). E por meio de uma meta- análise, foi avaliado o desempenho do ELISA utilizando o antígeno bruto de Leishmania spp. e rK39, relatando sensibilidades de 87% e 92% e especificidades de 77% e 81%, respectivamente (MAIA *et al.*, 2012).

Por outro lado, o ELISA utilizando peptídeos recombinantes é altamente específico, embora sua sensibilidade para detectar cães clinicamente saudáveis infectados possa variar dependendo do antígeno utilizado (METTLER *et al.*, 2005). A utilização de antígenos purificados sintéticos e recombinantes melhora a precisão do teste em comparação com o uso de antígenos brutos (PORROZZI *et al.*, 2007).

1.3.3. Ensaio de método molecular

Dessa maneira, devido a sensibilidade do diagnóstico laboratorial para LVA (no homem e animais), o método da PCR tornou-se uma excelente nova perspectiva para solucionar a problemática do diagnóstico da infecção por *L. (L.) chagasi* (CASTELLI *et al.*, 2021; FARIAS *et al.*, 2020; GALLUZZI *et al.*, 2018).

1.3.3.1. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Atualmente, os ensaios fundamentados na técnica da PCR são amplamente adotados por pesquisadores e profissionais de saúde (FERNANDES *et al.*, 2019; SUNDAR *et al.*, 2018). Nos últimos anos, a aplicação dessa técnica tem sido explorada no diagnóstico da LVA, com variados propósitos, incluindo a detecção da infecção, o diagnóstico da doença e o monitoramento da cura (FARIAS *et al.*, 2020; GALLUZZI *et al.*, 2018; VIANA *et al.*, 2008).

Na técnica da PCR, ocorre a amplificação *in vitro* do DNA, resultando em um aumento exponencial do número de cópias de sequências específicas a partir de um único DNA alvo. Esse processo básico envolve a utilização de iniciadores (pequenas moléculas de DNA de fita simples) que são complementares às regiões que cercam a sequência a ser amplificada no DNA alvo. Além disso, são necessários uma *Taq DNA polimerase* e deoxinucleotídeos trifosfatados (DNTP). A amplificação exponencial das sequências de DNA-alvo específicas requer condições que envolvem desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores e extensão, realizadas em ciclos alternados, os quais são promovidos pela variação da temperatura na presença dos componentes da reação (ERBER *et al.*, 2022; GALLUZZI *et al.*, 2018; SAIKI *et al.*, 1985; SUNDAR *et al.*, 2018).

Os tipos mais comuns da PCR são: PCR convencional, qPCR, NESTED-PCR, LAMP, RT-PCR e multiplex – PCR, os quais possuem diferenças entre si. Por exemplo: a PCR convencional e a qPCR, a segunda apresenta maior reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade, precisão e acurácia diagnóstica, além de também reproduzir resultados quantitativos, por conseguinte, sendo considerada mais vantajosa que a primeira (COSTA *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2021; TRIGO, 2018).

A escolha dos genes alvo para a PCR é uma fase crucial, já que pode afetar tanto a sensibilidade quanto a especificidade da técnica. Um dos alvos de amplificação do DNA mais utilizados é o DNA do cinetoplasto (kDNA), uma estrutura que abriga uma região com alta homologia entre as diferentes espécies de *Leishmania*, conhecida como região conservada do kDNA (CHICHARRO *et al.*, 2002; SCHALLIG; OSKAM, 2002).

Com essa metodologia promissora, diversos primers foram desenhados e testados pela comunidade científica, sempre em busca de maiores especificidades e sensibilidades (FARIAS *et al.*, 2020; SUNDAR *et al.*, 2018).

Nesse sentido, no diagnóstico de LVA, para identificação de *L. (L.) chagasi* por meio da qPCR, vem sendo utilizados os iniciadores: *LEISH-1* (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e *LEISH-2* (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), que possuem como alvo o kDNA de *L. (L.) chagasi* , os quais são espécie-específico (FERNANDES *et al.*, 2019; FRANCINO *et al.*, 2006).

As técnicas de PCR permitem a amplificação do DNA do parasito encontrado em diversas amostras biológicas, como sangue periférico, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos, e soro. Em geral, em pacientes imunocompetentes, foram relatadas sensibilidades variando de 91% a 100% e especificidades variando de 87% a 100% para a PCR usando sangue periférico (DISCH *et al.*, 2003; MAURYA *et al.*, 2005; WU *et al.*, 1997). Quanto

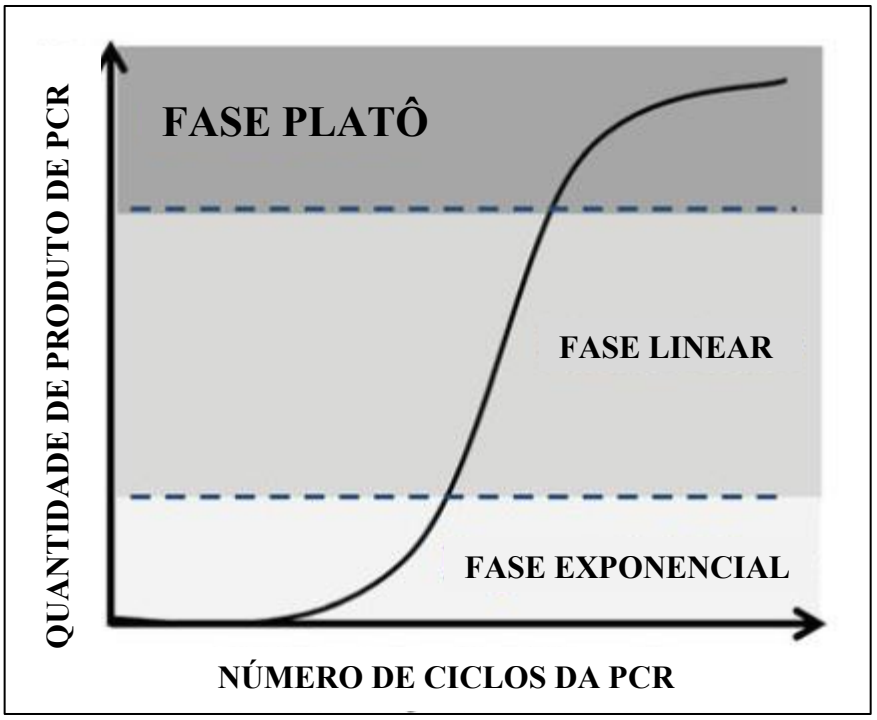
ao aspirado de medula óssea, a sensibilidade varia de 83% a 100% (KATAKURA *et al.*, 1998; SALOTRA *et al.*, 2001), enquanto para o aspirado de linfonodos, varia de 87% a 100% (ANDRESEN *et al.*, 1997; OSMAN *et al.*, 1997). Ao utilizar soro, foram relatadas sensibilidades variando de 84% a 97% e especificidades variando de 95% a 100% (DE ASSIS *et al.*, 2009; FISSORE *et al.*, 2004).

1.3.3.1.1. PCR em Tempo Real (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi desenvolvida no início da década de 1990 (HIGUCHI *et al.*, 1992; HOLLAND *et al.*, 1991; LEE; CONNELL; BLOCH, 1993; LIVAK *et al.*, 1995), representando um dos mais importantes avanços no campo do diagnóstico molecular. Sua introdução permitiu maior sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de agentes etiológicos, especialmente em doenças infecciosas parasitárias como a LVA, cujo diagnóstico enfrenta desafios relacionados à baixa carga parasitária e à necessidade de métodos acurados (DE RUITER *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2018; RIHS *et al.*, 2025a).

A principal diferença entre a qPCR e o PCR convencional reside na detecção do produto amplificado: na qPCR, a detecção ocorre durante a fase exponencial da amplificação, o que confere maior precisão e sensibilidade, enquanto no PCR convencional a detecção é realizada ao final da reação, na fase de platô (Figura 5), geralmente por eletroforese em gel (PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010; PERIS *et al.*, 2021). Essa característica elimina a necessidade de etapas pós-amplificação, reduzindo o risco de contaminação e aumentando a reprodutibilidade dos resultados (RIHS *et al.*, 2025b).

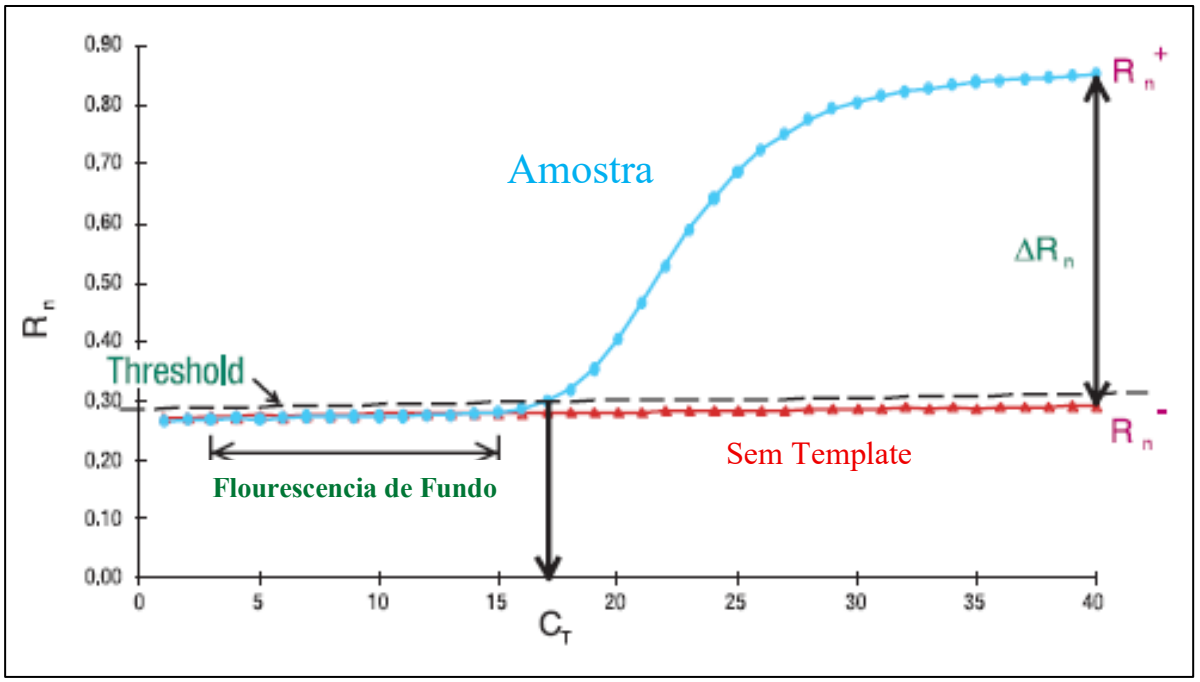
Figura 5 - Modelo da curva de amplificação do PCR



Fonte: Adaptado de NASSIRI *et al.,* 2018.

O equipamento de qPCR é composto por um termociclador acoplado a um sistema óptico que detecta a fluorescência emitida por moléculas repórteres adicionadas à reação. AF cada ciclo de amplificação, a fluorescência aumenta proporcionalmente à quantidade de *amplicons* gerados, sendo monitorada e analisada por softwares específicos que normalizam e interpretam os dados brutos (PFAFFL, 2001; REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Essa análise envolve a correção do baseline — que delimita os ciclos iniciais onde não há amplificação significativa — e a definição do limiar (*threshold*), a partir do qual a fluorescência é considerada indicativa da presença do alvo (BUSTIN *et al.*, 2009). O ciclo em que a fluorescência do produto cruza o *threshold* é denominado ciclo de quantificação (Cq), sendo inversamente proporcional à quantidade inicial do DNA alvo e a C_t (*Ciclo Threshold*) é a intersecção entre uma curva de amplificação e a linha *threshold,* conforme mostrado na figura 6 (POMARI *et al.*, 2019).

Figura 6 - Gráfico representando o valor de C_T na amplificação por PCR.

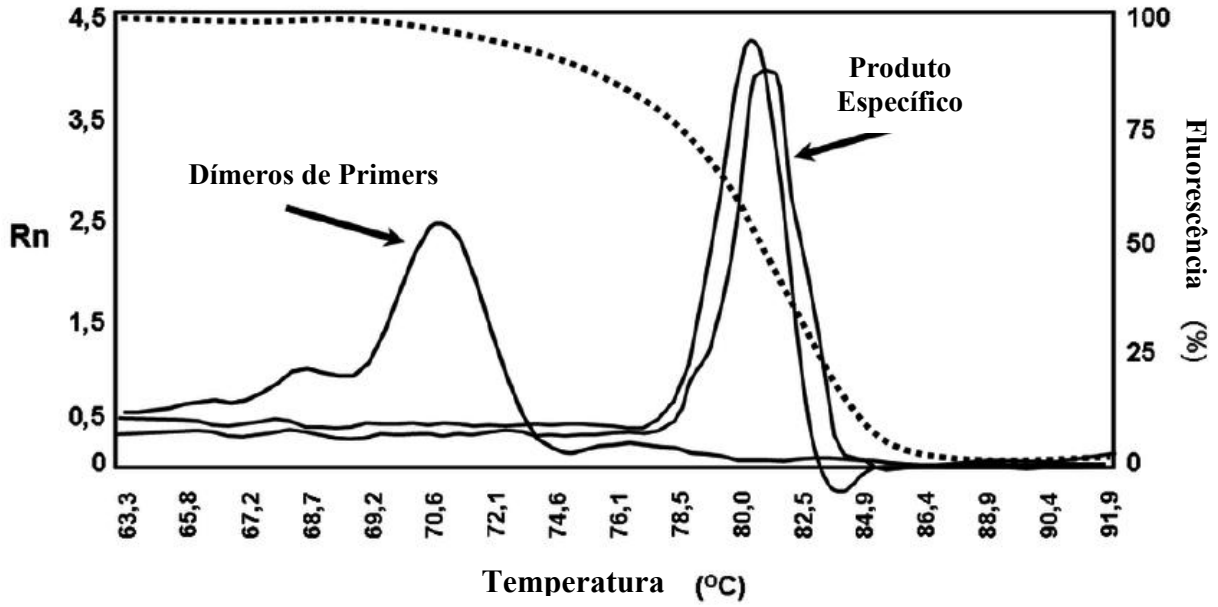


Fonte: Adaptado de MAITY; CHAKRABORTY., 2022.

No contexto da LVA, a qPCR tem se consolidado como uma ferramenta essencial para a detecção de DNA de *L. (L.) chagasi*, devido à sua capacidade de identificar baixas cargas parasitárias, especialmente em amostras de sangue periférico ou soro, que apresentam menor risco ao paciente e maior facilidade de coleta (BARTHOLAZZI JUNIOR *et al.*, 2019; SUNDAR *et al.*, 2018).

Entre as principais estratégias de detecção utilizadas na qPCR, destacam-se o uso de corantes intercalantes como o *SYBR Green* e as sondas de hidrólise (*TaqMan*®). O *SYBR Green* se liga à fita dupla de DNA, emitindo fluorescência detectada pelo equipamento, sendo uma abordagem sensível e de baixo custo, frequentemente empregada em triagens de infecção por *Leishmania* (AVELAR *et al.*, 2025; PERIS *et al.*, 2021). No entanto, as moléculas do corante se ligam a qualquer DNA dupla-fita, inclusive a dímeros de iniciadores e produtos de amplificação inespecífica (Figura 7). Desse modo, a inespecificidade do corante demanda a realização de curvas de dissociação (*melting curves*), que permitem verificar a especificidade do produto amplificado, através da análise da temperatura de *melting (Tm)* característica de cada sequência (BUSTIN, 2024; KUBISTA *et al.*, 2006).

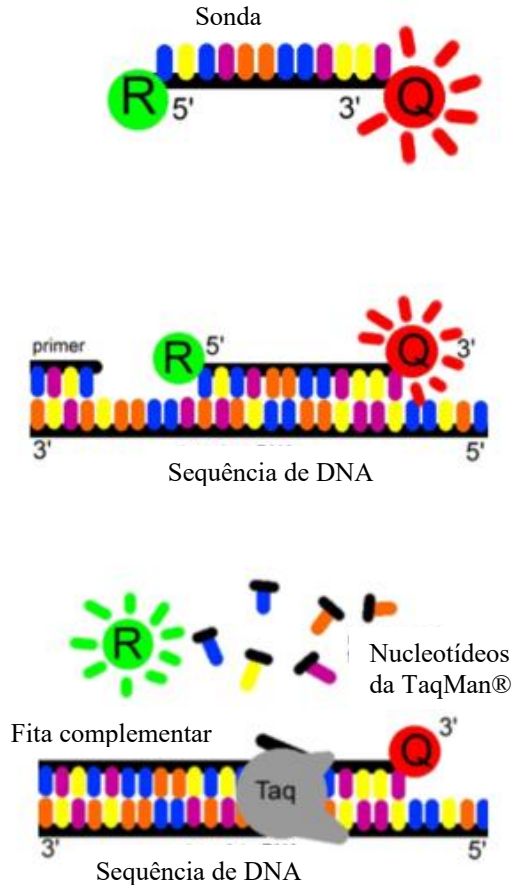
Figura 7 - Representação de um curva de dissociação com *SYBR Green*



Fonte: Adaptado de PRADA-ARISMENDY; CASTELLANOS., 2011.

Por outro lado, sondas específicas como as *TaqMan*® aumentam a especificidade do ensaio, reduzindo o risco de falsos positivos, uma vantagem especialmente relevante no diagnóstico da LVA em áreas de co-endemicidade com outras espécies de *Leishmania* ou tripanosomatídeos (BARTHOLAZZI JUNIOR *et al.*, 2019; SUNDAR *et al.*, 2018). As sondas *TaqMan*® consistem em oligonucleotídeos marcados com um fluoróforo chamado *reporter* e um inibidor de fluorescência chamado *quencher* que, quando degradadas pela atividade exonuclease da *Taq DNA polimerase*, A degradação da sonda promove a separação entre o *reporter* e o *quencher* e o aparelho então detecta a fluorescência emitida pelo *reporter* livre, liberando fluorescência proporcional à amplificação do DNA alvo, conforme a figura 8 (BUSTIN *et al.*, 2009).

Figura 8 - Representação esquemática do funcionamento do sistema TaqMan® de detecção



Fonte: Adaptado de PRADA-ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011.

Além da detecção qualitativa, a qPCR permite quantificar com precisão a carga parasitária, seja de forma absoluta, por meio de curvas padrão construídas com diluições seriadas de DNA conhecido, ou de forma relativa, utilizando genes endógenos como referência (PFAFFL, 2001; REITHINGER; DUJARDIN, 2007). No diagnóstico da LVA, essa quantificação é importante tanto para monitorar a evolução da infecção quanto para avaliar a resposta terapêutica (GALLUZZI *et al.*, 2018).

A construção de curvas padrão fornece parâmetros essenciais para validar a reação, como a eficiência, calculada a partir do *slope* da curva, e o coeficiente de correlação (R^2), que avalia a linearidade entre as concentrações padrão e os valores de Cq obtidos (BUSTIN *et al.*, 2009; KUBISTA *et al.*, 2006). Ensaios com eficiência entre 90-110% e R^2 acima de 0,98 são considerados robustos e confiáveis (BUSTIN *et al.*, 2009; KUBISTA *et al.*, 2006).

Outro aspecto fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados na qPCR é a inclusão de controles internos (CI), que monitoram a eficiência da extração, a presença de inibidores e a integridade dos reagentes. Tais controles podem ser endógenos, como genes

constitutivos da célula hospedeira ou exógenos, como alvos moleculares adicionados à amostra antes da extração (SILVA *et al.*, 2016). Na detecção de LVA, o uso de controles internos é imprescindível, especialmente em amostras de difícil manipulação ou com baixa carga parasitária.

Com o crescimento exponencial da aplicação do qPCR na área da parasitologia, foram estabelecidas diretrizes internacionais que padronizam a terminologia e os parâmetros mínimos necessários para a validação de ensaios, tais como o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009). O seguimento dessas recomendações é crucial para garantir a comparabilidade entre estudos e a reprodutibilidade dos resultados, aspectos indispensáveis para a utilização do qPCR como ferramenta diagnóstica e epidemiológica na vigilância da LVA (BROEDERS *et al.*, 2014).

Além disso, novas abordagens, como a digital PCR (dPCR), vêm sendo exploradas para o diagnóstico da LVA, oferecendo vantagens como a detecção absoluta de cópias alvo sem a necessidade de curvas padrão, embora sua aplicação ainda seja limitada devido aos altos custos e à necessidade de equipamentos especializados (POMARI *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2019).

Em suma, a qPCR representa atualmente uma das metodologias mais sensíveis, específicas e rápidas para o diagnóstico e monitoramento da LVA, contribuindo significativamente para o avanço das ações de vigilância epidemiológica e para a melhoria do prognóstico dos pacientes acometidos.

Assim, este estudo propôs a utilização da qPCR, uma metodologia molecular sensível e espécie-específica, aplicada a amostras de soro de cães domésticos e animais silvestres provenientes de área endêmica, com o objetivo de contribuir para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial e fortalecer as ações de vigilância ecoepidemiológica da LVA. A utilização do soro como amostra biológica apresenta vantagens importantes, como a facilidade de coleta, menor inatividade, possibilidade de armazenamento em freezer e utilização em diferentes métodos diagnósticos, reduzindo custos e tempo de pesquisa (BARTHOLAZZI JUNIOR *et al.*, 2019). Além disso, a escolha da qPCR justifica-se pela sua elevada sensibilidade e especificidade para a identificação de *L. (L.) chagasi*, especialmente com o uso de primers como *Leish-1/Leish-2*, amplamente empregados em estudos anteriores (FARIAS *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2019; TRIGO, 2018). Dessa forma, este trabalho visa atender às recomendações da Organização Mundial da Saúde, que destaca a necessidade de estudos epidemiológicos e o aperfeiçoamento de metodologias para subsidiar estratégias de controle da LVA (WHO, 2024b).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um estudo de qPCR para o diagnóstico molecular de *Leishmania (Leishmania) Chagasi* em soro de cães domésticos e animais silvestres provenientes de área endêmica e não endêmica de do Estado do Pará.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a extração de DNA a partir de amostras de soro de cães domésticos e animais silvestres oriundos de áreas endêmicas e não endêmicas do Estado do Pará;
- Avaliar a viabilidade, otimização, sensibilidade e especificidade do sistema de qPCR proposto, com amostras controle;
- Detectar a infecção por *L. (L.) chagasi* nos soros de animais: domésticos e silvestres (ELISA - indireto);
- Detectar e quantificar o DNA de *L. (L.) chagasi*, por qPCR, em amostras de soro de cães domésticos e animais silvestres;
- Comparar o desempenho do qPCR com ELISA-indireto, verificando concordância diagnóstica e aplicabilidade em condições laboratoriais;
- Realizar a análise *in sílico* dos *primers* e da sonda utilizados na reação de qPCR, com base em sequências depositadas em bancos de dados, visando verificar especificidade em *L. (L.) chagasi*.

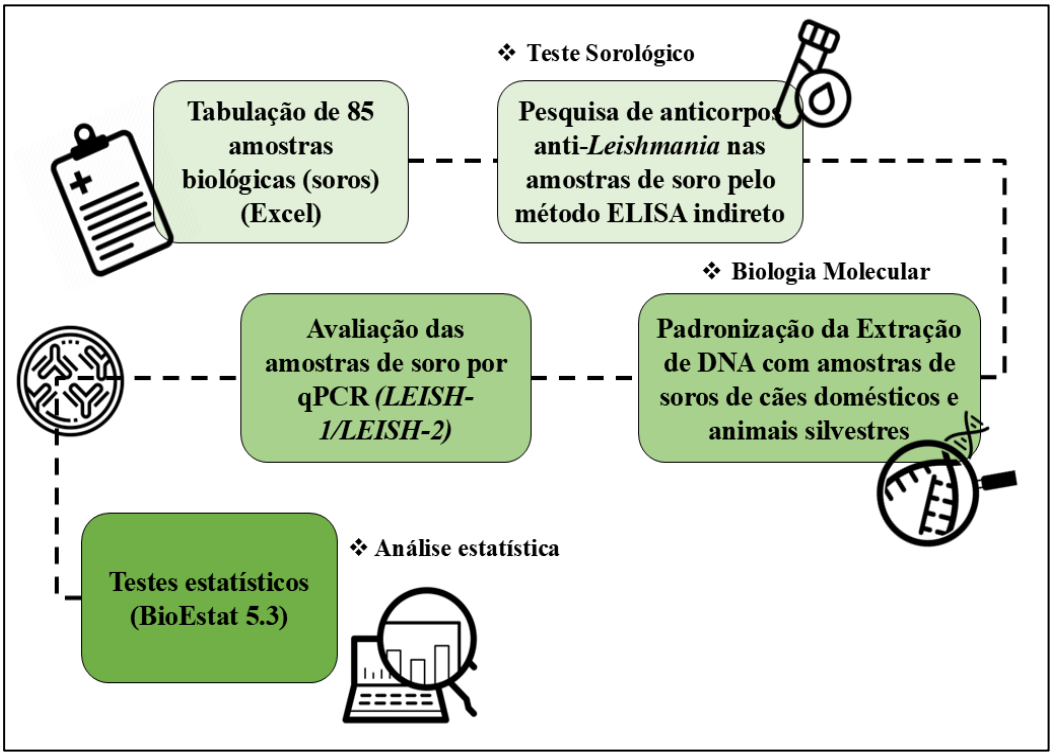
3. METODOLOGIA

3.1. DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi do tipo experimental transversal retrospectivo, foram utilizadas 85 amostras de soros, sendo 60 soros de cães domésticos e 25 soros de animais silvestres [marsupiais (03), roedores (04) e raposas (18)], que estavam armazenados previamente no biobanco da Seção de Parasitologia (SEPAR) do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Todos os resultados deste projeto foram registrados em planilha *Microsoft Office Professional Plus 2019* – Excel e, posteriormente analisadas pelo programa Bioestat 5.0 (Figura 9).

Figura 9 - Desenho do estudo e atividades que foram realizadas.



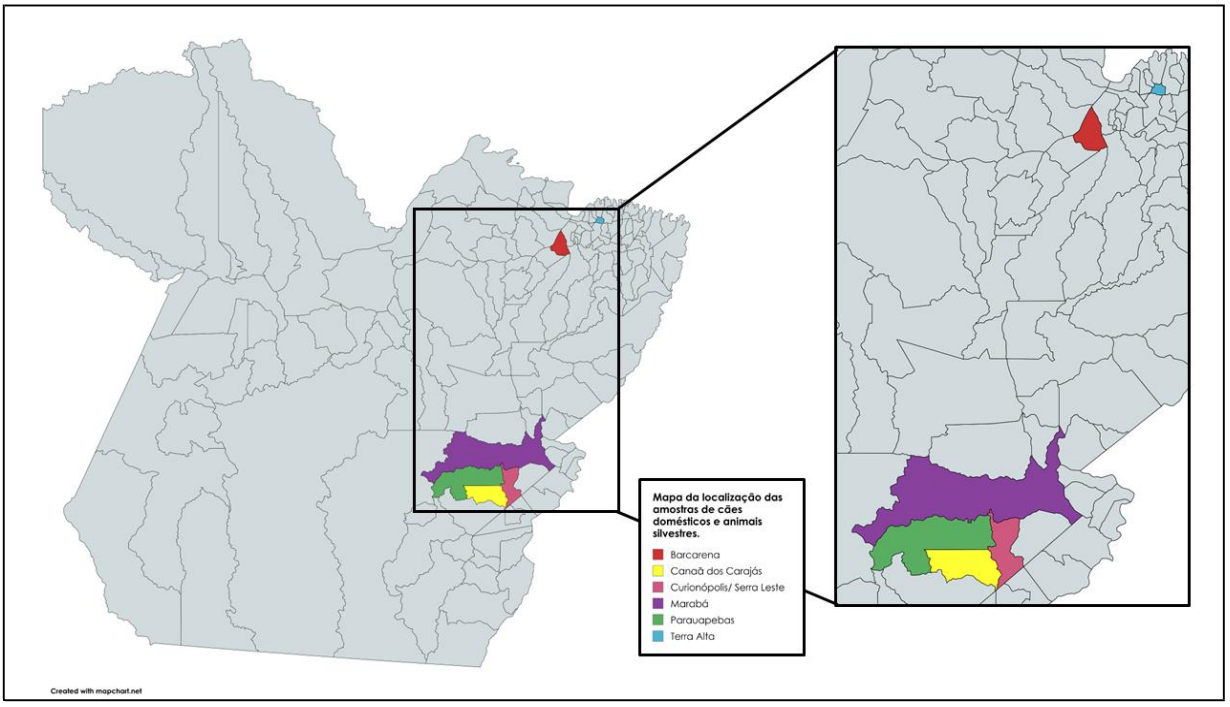
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2024

3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas foram cedidas pelo Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson” (LLEISHRL), Seção de Parasitologia, Ananindeua, Pará, Brasil e pela Seção de Arbovirologia – SEARB.

As amostras de soros de cães domésticos (60) foram oriundas do estudo “Prevalência da infecção canina causada por *L. (L.) chagasi* determinada pela PCR em amostras do aspirado de linfonodo” (ANEXO A) realizado no município de Barcarena (2011-2012). Enquanto, as amostras de soros de animais silvestres (25) foram provenientes do estudo “Avaliação das alterações ambientais e sociais e sua influência no quadro nosológico nas áreas de influência das Minas de Ferro do Complexo Carajás Norte, Projeto Ferro Carajás S11D, Projeto Serra Leste, Mina do Manganês do Azul e do Salobo" (ANEXO B), sendo dos municípios de Parauapebas, Curionópolis, Canaã dos Carajás, Terra Alta e Marabá. (Figura 10 e 11).

Figura 10 - Mapa da localização das amostras de cães domésticos e animais silvestres.



Fonte: Protocolo de pesquisa utilizando o programa: www.mapchart.net, 2024

As amostras biológicas de animais silvestres incluíram um total de 25 indivíduos, distribuídos da seguinte forma: marsupiais (n = 3), pertencentes aos gêneros *Didelphis* spp. e *Philander* spp.; pequenos roedores (n = 4), dos gêneros *Necromys* spp., *Proechimys* spp. e *Oxymycterus* spp.; e raposas (n = 18), todas da espécie *Cerdocyon thous*. Além dessas, foram analisadas 60 amostras de soro de cães domésticos (*Canis familiaris*). No total, 85 amostras de soro (provenientes de animais silvestres e domésticos) foram submetidas à avaliação por ELISA indireto e qPCR (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de animais silvestres e doméstico

Categoria	Gênero/Espécie	Quantidade
Marsupiais	*Didelphis* spp*, Philander* spp	3
Pequenos roedores	*Necromys* spp*, Proechimys* spp*, Oxmycteryus* spp	4
Raposa	*Cerdocyon thous*	18
Cães	*Canis familiares*	60
TOTAL	**-**	**85**

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025

No teste sorológico (ELISA indireto IgG), foram utilizados soros-controle positivos e negativos já padronizados na rotina do Laboratório de Sorologia de Leishmanioses 'Prof. Dr. Ralph Lainson', do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os soros controle negativos de cães foram obtidos de animais domiciliados em Belém, uma área não endêmica para leishmanioses. Esses cães não apresentavam sinais clínicos da doença e eram negativos para leishmaniose visceral canina (LVC) nos testes sorológicos (RIFI-IgG). Já os soros-controle positivos eram provenientes de cães infectados com *L. (L.) chagasi*, confirmados por cultura, PCR, sorologia positiva para LVC e presença de sinais clínicos compatíveis com a doença.

Para os testes realizados em animais silvestres, foram utilizados como controles negativos cinco amostras de animais que apresentaram resultados negativos nas análises sorológicas (RIFI e ELISA) e moleculares.

Vale destacar que todos os soros-controle foram utilizados durante a realização do ELISA - indireto, seguindo rigorosamente o protocolo estabelecido pelo laboratório de leishmanioses 'Prof. Dr. Ralph Lainson'.

Para a qPCR, foram utilizados como controles positivos três cepas de *L. (L.) chagasi*,

previamente isoladas, caracterizadas e mantidas em cultivo in vitro: MCER/BR/1981/6445 (Salvaterra, Pará), MCAO/BR/2010/M27840 (Barcarena, Pará) e MHOM/HD/2017/M32502 (Amapala District, Honduras) (Tabela 2). Além das cepas, também foi incluído como controle positivo um soro de cão doméstico com resultado positivo tanto na qPCR quanto nas análises sorológicas (RIFI e ELISA - IgG).

Como controles negativos, foram utilizados o NTC (controle sem *template*, contendo apenas água ultrapura) e um soro de cão doméstico proveniente de área não endêmica para leishmaniose (GOLÇAVES *et al.,* 2019). Esse cão apresentou resultados negativos tanto para a qPCR quanto para as metodologias sorológicas (RIFI e ELISA - IgG).

Tabela 2 - Cepas de *L. (L.) chagasi* provenientes do criobanco do laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson"

Espécie	**Cepas**
Leishmania (L.) chagasi	MCER/BR/1981/6445/Salvaterra/Pará[(a)]
Leishmania (L.) chagasi	MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará[(b)]
Leishmania (L.) chagasi	MHOM/HD/2017/M32502/Amapala District/Honduras[(c)]

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2024. (a) Isolado de raposa (*Cerdocyon thous*); (b) Isolado de cão (*Canis familiaris*); (c) Isolado de paciente com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

3.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA INDIRETO

A detecção de anticorpos IgG nos soros foi realizada em microplacas de poliestireno de fundo plano com 96 poços. Antes da sensibilização das placas, a concentração de proteínas solúveis do antígeno foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), com o objetivo de padronizar a concentração proteica a ser utilizada.

As placas foram então sensibilizadas com antígeno solúvel de amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, na concentração de 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,5). A incubação foi realizada em câmara úmida, durante a noite, sob refrigeração (4°C).

No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Posteriormente, foi realizada a etapa de bloqueio com albumina bovina a 10% em PBS, incubada por 2 horas a 37°C, também em câmara úmida, seguida de nova lavagem com PBS-T.

As amostras de soro foram então adicionadas aos poços (100 µL), na diluição de 1:400 em PBS-T, e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG canino (para as amostras de canídeos – cães domésticos e raposas) ou anti-

IgG de rato (para pequenos roedores e marsupiais), ambos conjugados à fosfatase alcalina. Os conjugados foram utilizados na diluição de 1:2000 em PBS-T (100 µL por poço), com incubação por 45 minutos a 37°C.

Para o desenvolvimento da reação, foi utilizado o substrato cromogênico p-nitrofenilfosfato (PNPP-Sigma), diluído em tampão carbonato-bicarbonato. Após adição de 100 µL do substrato por poço, as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 405 nm (LIMA et al., 2017).

Os resultados foram considerados reagentes quando os valores de densidade óptica foram iguais ou superiores a três desvios-padrão em relação ao ponto de corte (*cut-off*), estabelecido com base nos resultados dos controles negativos (LIMA et al., 2017; VOLLER, BIDWELL; BARLETT, 1976).

3.4. CULTIVO DE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* SP

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (MCER/BR/1981/6445 – Salvaterra/Pará; MCAO/BR/2010/M27840 – Barcarena/Pará; e MHOM/HD/2017/M32502 – Amapala District/Honduras) como controle positivo nas reações de qPCR, conforme descrito anteriormente (Tabela 2). Além disso, cepas causadoras de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e de *Trypanosoma* sp. foram incluídas para a avaliação da especificidade da reação (seção 3.7.4), sendo elas: IFLA/BR/1967/PH8 – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; MHOM/BR/1975/M2904 – *Leishmania (Viannia) braziliensis*; MHOM/BR/1996/M15729 – *Leishmania (Viannia) lindenbergi*; MROD/BR/2022/M34432 e MROD/BR/2022/M34439 – *Trypanosoma* sp.

Todas as cepas foram obtidas a partir do criobanco do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC) 'Prof. Dr. Ralph Lainson'. Inicialmente, os parasitos foram cultivados em meio NNN e, posteriormente, transferidos para meio RPMI 1640 (isento de fenol vermelho), pH 7,2, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina, para a obtenção de formas promastigotas em fase estacionária.

Após três repiques consecutivos, as formas promastigotas foram lavadas três vezes com solução salina fosfatada (PBS: 14 mM NaCl; 2,5 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 7,4 mM Na_2HPO_4; pH 7,2), por centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Os *pellets* obtidos foram então armazenados a -20°C até a utilização nas análises (RAMOS et al., 2009; SILVEIRA et al., 2021a).

Tabela 3 - Cepas usadas no teste de especificidade provenientes do criobanco do laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson".

Espécies	Cepas
Leishmania (L.) amazonensis	IFLA/BR/1967/PH8
Leishmania (V.) braziliensis	MHOM/BR/1975/M2904
Leishmania (V.) lindenbergui	MHOM/BR/1996/M15729
Trypanossoma sp.	MROD/BR/2022/M34432
Trypanossoma sp	MROD/BR/2022/M34439

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025

3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE SORO A PARTIR DE AMOSTRAS DE CÃES E ANIMAIS SILVESTRES

O DNA foi extraído tanto das amostras de soros de cães domésticos, soros de animais silvestres quanto das cepas de cultura padrão de leishmaniose visceral utilizando-se o kit: *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, USA)*, conforme recomendações do fabricante (PROMEGA CORPORATION, 2013).

3.6. QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA EXTRAÍDAS

A quantificação das amostras extraídas de DNA de soro foi realizada com equipamento Qubit Q32857 *Fluorometer (Invitrogen USA),* de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado como parâmetro dos testes de biologia molecular a quantidade de 25-28 µM de DNA.

3.7. TESTES DE PCR EM TEMPO REAL PARA VALIDAÇÃO DO DIAGNÓSTICO COM SORO

3.7.1. Teste de Viabilidade dos Iniciadores e Sonda

Para verificar preliminarmente o funcionamento dos kits utilizados nos testes, foi realizado um teste piloto. Nesta etapa, foram utilizados como controles positivos o DNA extraído de cepas padrão de *L. (L.) chagasi* e de soro de cães domésticos positivos para LVC, previamente caracterizados e utilizados rotineiramente no setor de Sorologia do LLEISHRL. Como controle negativo, utilizou-se DNA extraído de soro de um cão doméstico proveniente da Região Metropolitana de Belém, também utilizado como controle de rotina no setor, com diagnóstico negativo para LVC.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de amplificação utilizando os iniciadores Leish-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e Leish-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3').

A reação de qPCR foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo: 1 µM de cada *primer*, 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2x), 0,2 µM da sonda *TaqMan®-MGB Probe* (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-non-fluorescent quencher-MGB; Applied Biosystems, EUA) e CXR Reference Dye diluído na proporção de 2 µL por mL de GoTaq® *Probe* utilizado. As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. As reações foram conduzidas no equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), conforme descrito por FERNANDES *et al.* (2019) e FRANCINO *et al.* (2006).

3.7.2. Otimização das condições ideais de reação

3.7.2.1. Teste das Concentração dos Iniciadores

Foi realizada uma matriz de diferentes combinações de concentrações dos primers *Forward e Reverse* (1000, 900, 700, 500 e 200 nM), a fim de identificar a condição ideal dos primers a serem utilizados. As amostras utilizadas incluíram DNA da cepa padrão de L. (L.) chagasi (20–30 ng/µL) e NTC (água ultrapura). As reações foram realizadas conforme o protocolo de mix e de ciclagem da etapa anterior (tópico 3.7.1).

3.7.2.2. Teste das Concentrações da Sonda

Testaram cinco concentrações da sonda (250nM, 200nM, 150nM, 100nM e 50nM), mantendo os *primers* a 500nM. As reações foram executadas em duplicata com os mesmos controles da etapa anterior e realizadas conforme o protocolo de mix e de ciclagem da etapa anterior (tópico 3.7.1). O objetivo foi verificar o menor valor de sonda capaz de garantir sensibilidade e especificidade adequadas.

3.7.3. Avaliação da Eficiência da Reação

Uma curva padrão foi construída com diluições decimais seriadas do DNA da cepa MCAO/BR/2010/M27840 (de $1/10^4$ a $1/10^8$), As reações foram executadas em duplicata com os mesmos controles da etapa anterior e realizadas conforme o protocolo de mix e de ciclagem da etapa anterior (tópico 3.7.1).

Os valores de *Cq (quantification cycle* ou quantificação por ciclo) obtidos em cada diluição foram plotados em função do logaritmo da concentração relativa de DNA, gerando uma curva padrão. A partir desta, foram calculados o coeficiente de determinação (R^2), a eficiência da reação e o *slope (*coeficiente angular da reta) (BUSTIN et al., 2009; KUBISTA et al., 2006), utilizando a equação:

$$\mathbf{E=(10^{-1/slope}-1)\times 100}$$

Esses parâmetros permitiram a determinação da faixa dinâmica linear, caracterizada pelas diluições em que houve amplificação eficiente e linear, além do limite de detecção (LOD), definido como a menor concentração detectável com consistência entre as réplicas (BUSTIN et al., 2009; KUBISTA et al., 2006).

3.7.4. Avaliação da Especificidade da Reação

Para testar a especificidade dos *primers* e da sonda, foram incluídas amostras de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar americana (LTA): *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); *Leishmania (V.) braziliensis*: (MHOM/BR/1975/M2904); *Leishmania (V.) lindenbergui* (MHOM/BR/1996/M15729) e de *Trypanosoma* sp.: MROD/BR/2022/M34432; MROD/BR/2022/M34439 , além da cepa padrão de *L. (L.) chagasi* (controle positivo) e NTC (controle negativo). As reações seguiram o protocolo padrão de qPCR apresentado nas etapas anteriores (tópico 3.7.1).

3.7.5. Avaliação dos Limites de Detecção

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade do protocolo de qPCR na detecção de DNA de *L. (L.) chagasi* em amostras de soro animal, foi conduzido um teste com um painel composto por amostras positivas e negativas para LVA, bem como por amostras positivas para outros patógenos.

Foram testadas 85 amostras de soro, divididas em três grupos:

- **Grupo 1:** 30 amostras com resultado positivo no teste RIFI para anticorpos IgG contra *L. L. (chagasi),* provenientes de área endêmica -Barcarena/PA- previamente testadas no Instituto Evandro Chagas (IEC) (DE JESUS *et al.,* 2016).
- **Grupo 2:** 30 amostras com resultado negativo no teste RIFI para anticorpos IgG contra *L. L. (chagasi)*, residentes em áreas não endêmicas para LVA, especificamente na Região Metropolitana de Belém (PA) (DE JESUS *et al.,* 2016).
- **Grupo 3:** 25 amostras de soro de animais silvestres, previamente classificadas como positivas ou negativas para LVA, conforme descrito na seção 3.2.
- Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata, com inclusão de um controle negativo (NTC – controle sem *template*) e um controle positivo, cepa padrão de *L. (L.) chagasi* (MCAO/BR/2010/M27840), diluídas a 1/1.000.000.

Os resultados obtidos na qPCR foram posteriormente comparados aos resultados do ELISA, com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico do protocolo molecular frente ao método sorológico de referência.

3.7.6. Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres por qPCR

As reações foram executadas em duplicata com os mesmos controles da etapa anterior e realizadas conforme o protocolo de mix e de ciclagem da etapa anterior (tópico 3.7.1).

Para o teste de sensibilidade, com o objetivo de avaliar a capacidade dos *primers* e da sonda em detectar amostras sorológicas positivas para LVA, foram analisadas 30 amostras de soro de cães domésticos, proveniente de região endêmica, previamente classificados como positivos pelo teste ELISA - indireto, conforme descrito no ANEXO C

Para realizar o teste clínico de especificidade, ou seja, avaliar o quão específicos eram os primers e a sonda frente a amostras sorológicas negativas para LVA, foram analisadas 30 amostras de soro de cães domésticos, provenientes de área não endêmica, previamente classificados como negativos pelo teste ELISA - indireto, conforme apresentado na ANEXO C.

E por fim, para avaliação das amostras de animais silvestres, foi conduzido um teste com diferentes amostras de soro, previamente classificadas como positivas e/ou negativas para LVA por ELISA - indireto, conforme apresentado na ANEXO C.

3.7.7. Análise de estruturas moleculares *primers* e sondas

Para investigar possíveis problemas de especificidade dos primers e da sonda, foi realizado uma análise *in silico* entre as sequências dos oligonucleotídeos utilizados (*primers forward, reverse* e sonda).

Para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qPCR, foi empregada a ferramenta Primer-BLAST NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Essa plataforma combina o algoritmo BLAST com critérios de desenho de primers, permitindo simular o pareamento dos oligonucleotídeos com sequências genômicas depositadas em bancos de dados públicos. Dessa forma, foi possível identificar possíveis reações cruzadas com genomas de outras espécies, especialmente com organismos geneticamente próximos, como outras espécies de *Leishmania* ou de *Trypanosomatidae.* A ferramenta se mostrou essencial para avaliar se os primers e a sonda utilizados são de fato específicos para *L. (L.) chagasi* ou se apresentam potencial para amplificação inespecífica (KATOH; ASIMENOS; TOH, 2009; KHAN; CHEUNG, 2020; ZHANG *et al.*, 2025).

Para complementar a análise e avaliar o posicionamento dos oligonucleotídeos em relação à sequência-alvo, foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*). Essa ferramenta bioinformática é amplamente utilizada para comparar sequências genéticas de diferentes isolados, espécies ou variantes, permitindo observar regiões conservadas e variantes na sequência do minicírculo kDNA (KATOH; ASIMENOS; TOH, 2009; KHAN; CHEUNG, 2020; ZHANG *et al.*, 2025). A partir do alinhamento, foi possível verificar se os oligonucleotídeos estavam ancorados em regiões altamente conservadas e específicas de *L. (L.) chagasi*, ou se também reconheciam regiões compartilhadas com outras espécies do mesmo subgênero, o que poderia comprometer a especificidade diagnóstica do sistema. Dessa forma, as sequências dos primers, da sonda e de diferentes espécies de patógenos de interesse (incluindo *Leishmania sp.* e outros tripanosomatídeos) foram organizadas em formato FASTA e submetidas ao alinhamento utilizando o parâmetro --auto, que permite ao MAFFT selecionar automaticamente o algoritmo de alinhamento mais adequado, considerando as características das sequências.

Por fim, foi utilizada o software Geneious para realizar a análise físico-química dos oligonucleotídeos, incluindo parâmetros como temperatura de dissociação (Tm), conteúdo de GC, estabilidade térmica e estruturas secundárias (potencial de formação de dímeros e hairpins). E a ferramenta online RNAfold web server para a visualização dessas estruturas secundárias.

Essas propriedades são fundamentais para garantir o bom desempenho dos primers e da sonda em reações de qPCR, uma vez que influenciam diretamente na eficiência de hibridização, na especificidade e na estabilidade da amplificação. A avaliação desses parâmetros permitiu identificar possíveis limitações no desenho dos oligonucleotídeos, contribuindo para uma interpretação mais crítica dos resultados laboratoriais e para a identificação de fatores que possam ter comprometido a especificidade ou a sensibilidade da reação (KATOH; ASIMENOS; TOH, 2009; KHAN; CHEUNG, 2020; ZHANG *et al.*, 2025).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software BioEstat, versão 5.0 (AYRES *et al.*, 2007), considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A normalidade das distribuições das amostras foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre grupos com distribuição paramétrica, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) de um critério. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis.

A precisão das reações de qPCR foi avaliada por meio do Coeficiente de Variação (CV%), calculado entre as duplicatas de cada concentração testada. A eficiência da reação foi determinada por regressão linear, utilizando a curva padrão (logaritmo da concentração relativa de DNA versus valores de Cq).

Para a análise dos resultados obtidos no painel de amostras (positivas e negativas para LVA), foi aplicado o Teste Exato de Fisher, com o objetivo de comparar a frequência de resultados positivos e negativos obtidos pelo qPCR em diferentes grupos de amostras (animais domésticos e silvestres).

Adicionalmente, foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho diagnóstico:

- **Sensibilidade**: capacidade do qPCR em identificar os soros de animais positivos (verdadeiros positivos);
- **Especificidade**: capacidade do qPCR em identificar os soros de animais negativos (verdadeiros negativos);
- **Valor Preditivo Positivo (VPP)**: proporção de amostras positivas pelo qPCR que também foram positivas pelo teste de referência (ELISA);
- **Acurácia**: proporção total de classificações corretas (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos) em relação ao número total de amostras avaliadas;
- **F1-score**: métrica que combina sensibilidade e precisão, especialmente relevante em cenários com desequilíbrio entre classes;

- **Índice Kappa de Cohen**: avaliado para determinar o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo qPCR e pelo ELISA. A interpretação dos valores de Kappa seguiu os seguintes critérios: < 0: discordância; 0–0,20: pouca concordância; 0,21–0,40: fraca; 0,41–0,60: moderada; 0,61–0,80: substancial; 0,81–1,0: quase perfeita.

3.9. ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA/IEC) (ANEXO A, ANEXO B). Todos os procedimentos técnicos no laboratório foram realizados observando-se as normas e critérios pré-estabelecidos e exigidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

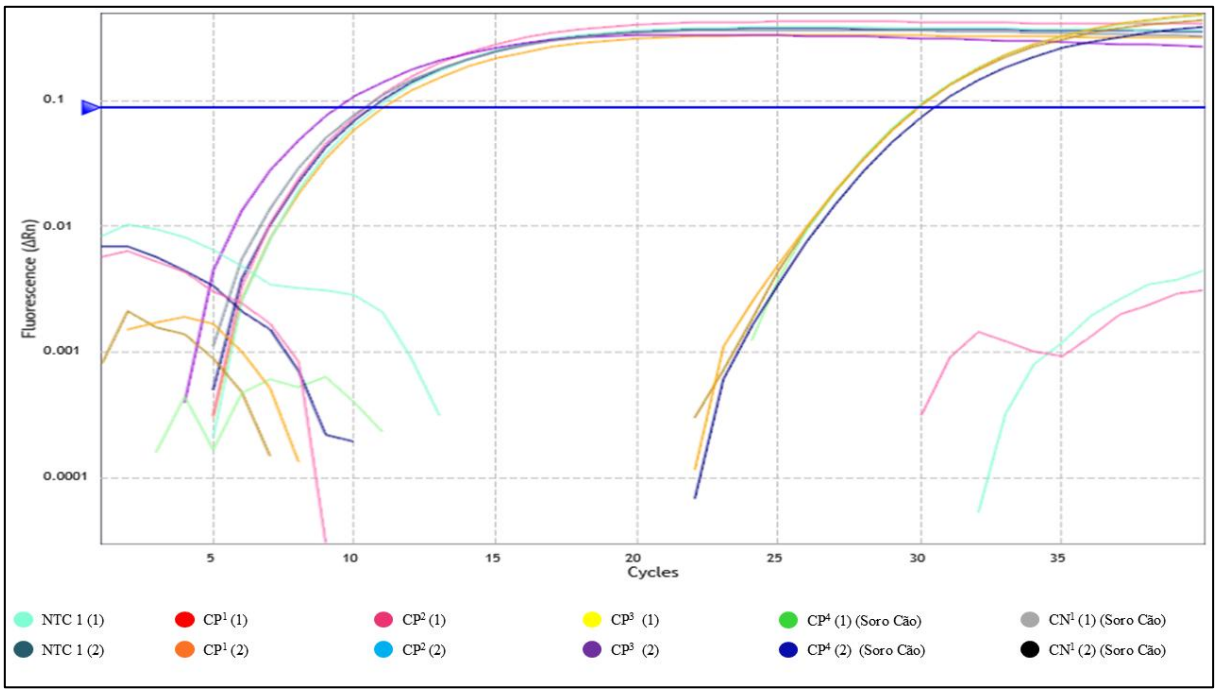
4.1. VIABILIDADE DOS INICIADORES, SONDA de qPCR

Para garantir a viabilidade do sistema de detecção por qPCR, foi realizado um teste piloto utilizando primers e sonda previamente descritos na literatura para detecção de *L. (L.) infantum* (FERNANDES *et al.*, 2019; FRANCINO *et al.*, 2006). Os primers Leish-1 e Leish-2, bem como a sonda TaqMan® utilizada, foram desenhados com base em estudos anteriores que utilizaram como alvo o DNA do minicírculo (*kDNA*) do kinetoplasto, região altamente conservada e amplamente utilizada como marcador molecular devido à sua alta cópia por célula e especificidade para o gênero *Leishmania* (CHICHARRO *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2019; FRANCINO *et al.*, 2006). Essa escolha baseou-se no fato de que a região do kDNA minicircular é uma das mais sensíveis para detecção do parasito, sendo particularmente útil em amostras com baixa carga parasitária, como o soro, que geralmente não é detectável por PCR convencional (MARY *et al.*, 2004; NICOLAS *et al.*, 2002).

A técnica de qPCR foi escolhida por oferecer maior sensibilidade e especificidade em comparação à PCR convencional (CASTELLI *et al.*, 2021; RIHS *et al.*, 2025a). Enquanto a PCR tradicional requer uma carga parasitária mais elevada para detecção visual por eletroforese, a qPCR é capaz de detectar mesmo pequenas quantidades de DNA, com alta precisão, o que a torna ideal para amostras como soro, onde a presença de DNA do parasito pode ser limitada. Além disso, a qPCR permite a quantificação da carga parasitária e monitora a amplificação em tempo real por meio da fluorescência emitida durante a degradação da sonda (MARCELINO *et al.*, 2020; PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010).

Foram testados em duplicata, os controles positivos provenientes da mesma espécie (*L. (L.) chagasi*), porém de cepas isoladas de indivíduos diferente (MCAO/BR/2010/M27840/BarcarenaPará,MHOM/HD/2017/M32502/AmapalaDistrict/Honduras,MCER/BR/1981/6445/Salvaterra/Pará). Foi utilizado também como controle positivo um soro de cão positivo e para controle negativo foi utilizado um soro de cão negativo de região não endêmica, ambos levando em conta métodos moleculares (qPCR) e métodos sorológico (RIFI e ELISA). Por fim, foi utilizado também o NTC (Controle sem *template*), no qual leva somente água ultrapura e mix da reação.

Figura 11 – Gráfico de amplificação de qPCR do Teste Piloto - Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Autoria própria (2025).

NTC (Controle sem *template*);

CP - Controle Positivo;

CN - Controle Negativo;

[1]MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará;

[2]MHOM/HD/2017/M32502/Amapala/Honduras;

[3]MCER/BR/1981/6445/Salvaterra/Pará.

Na Figura 11, os três isolados positivos de L. (L.) chagasi — provenientes de cão, humano e raposa — apresentaram valores baixos de Cq (entre 9,69 e 10,89), indicando alta carga parasitária e confirmando a eficiência do ensaio qPCR na detecção do DNA do parasito. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, que destaca o kDNA como uma região altamente conservada e sensível para detecção molecular em diferentes espécies e hospedeiros (CECCARELLI *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2019; FRANCINO *et al.*, 2006)

O controle positivo de soro canino também foi detectado (Cq = 29,90), demonstrando que a qPCR com os primers Leish-1 e Leish-2 é eficaz mesmo em matrizes mais complexas, como o soro. Isso reforça a vantagem da qPCR sobre a PCR convencional, principalmente em casos de baixa carga parasitária ou infecção subclínica (MARY *et al.*, 2004; PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010). O uso de sondas TaqMan® contribui para a maior especificidade do ensaio e reduz falsos positivos (PERIS et al., 2021).

A análise estatística dos valores de Cq foi iniciada pelo teste de Shapiro-Wilk, que

indicou distribuição não normal (p = 0,0087), justificando o uso de testes não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis comparou os três isolados de cultura (CP1, CP2 e CP3) e não apontou diferença significativa entre eles (p = 0,1561). Assim, optou-se pela cepa MCAO/BR/2010/M27840 como referência para os experimentos seguintes.

A proximidade entre os valores de Cq dos isolados e a ausência de diferença estatística validam a escolha de uma única cepa bem caracterizada como controle positivo, favorecendo a padronização, reprodutibilidade e comparabilidade dos ensaios (SILVA *et al.*, 2016). Essa decisão está alinhada aos objetivos do estudo, voltado ao desenvolvimento de métodos moleculares aplicáveis a cães domésticos e animais silvestres.

Tabela 4 - Amplificação do teste de viabilidade de primers e sonda.

Concetração Primer (*Leish-1/ Leish-2*)	**Concentração Sonda**	**Amostra testadas**	**Média do Cq (ΔRn)**
1 µM de *foward* para 1 µM de *reverse*	0,2 µM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Controle Negativo (Soro)*	30,24
		Controle Positivo (Soro)*	29,90
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	10,89
		Cultura 6445 (*L. (L.) chagasi*)*	9,96
		Cultura 32502 (*L. (L.) chagasi*)*	10,64

Fonte: protocolo de pesquisa, 2025.

*Amostras testadas em duplicatas.

Durante o teste de viabilidade (Figura 11, Tabela 4), observou-se que o controle negativo de soro canino apresentou amplificação com Cq = 30,24, enquanto o NTC (controle sem template) não apresentou sinal, confirmando a ausência de contaminação nos reagentes ou na montagem da placa.

A amplificação observada no soro negativo, com Cq próximo ao limite de detecção da técnica, sugere a ocorrência de amplificação inespecífica. Uma possível causa são interações entre os oligonucleotídeos e componentes da matriz do soro, já que amostras de animais sabidamente negativos podem conter outros patógenos ou substâncias interferentes (BUSTIN *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010).

Outro fator relevante é a proximidade entre o Cq do soro negativo (30,24) e o do controle positivo de soro (29,90), o que pode indicar ruído de fundo da reação. Esse tipo de sinal fraco é compatível com reações no limite de detecção e pode não refletir presença real de DNA-alvo (BUSTIN *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010).

A hipótese mais consistente, no entanto, é a baixa especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, especialmente da sonda. Essa suspeita foi reforçada por análises *in sílico* que apontaram falhas na ancoragem da sonda à sequência-alvo (KATOH; ASIMENOS; TOH, 2009; KHAN; CHEUNG, 2020; ZHANG *et al.*, 2025).

Como essa etapa ainda correspondia à fase inicial de padronização do ensaio, não era possível confirmar com segurança se a amplificação observada se devia exclusivamente ao desenho dos oligonucleotídeos. Diante disso, optou-se por retirar o controle negativo biológico (soro canino) das etapas seguintes. Essa decisão foi fundamentada na ausência de amplificação no NTC, indicando que o sistema estava livre de contaminação.

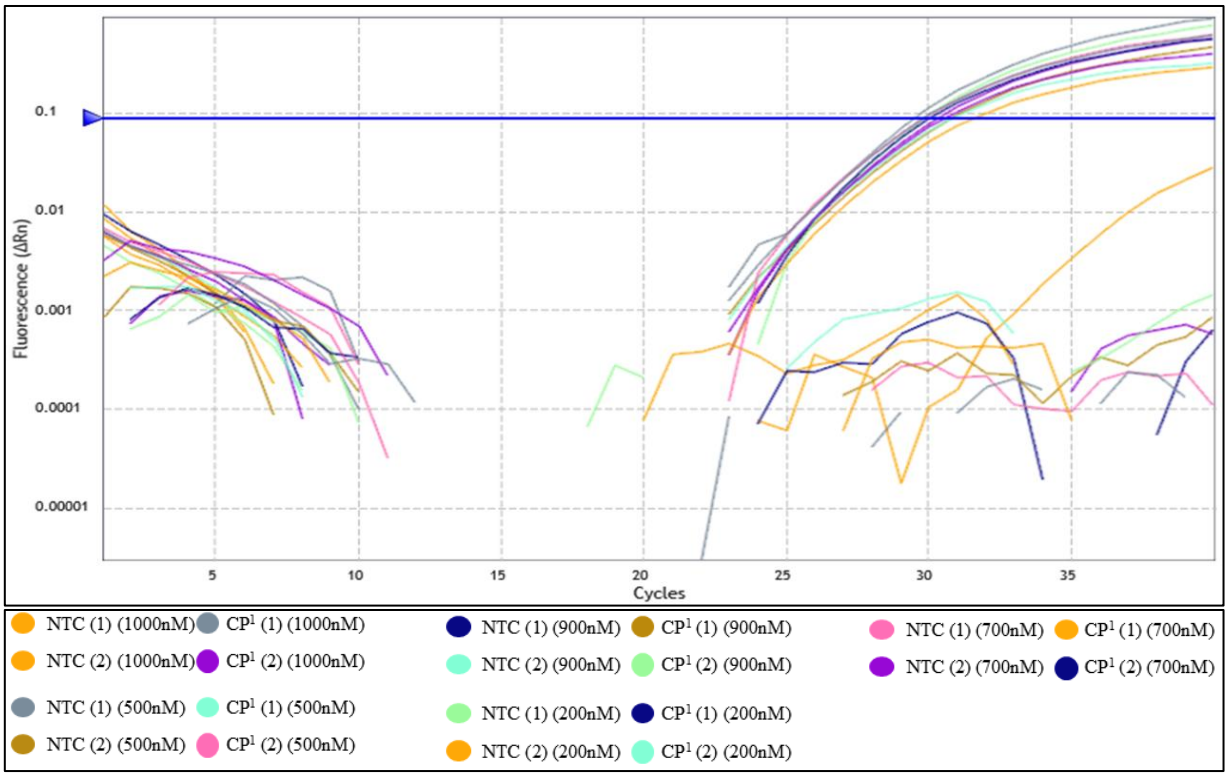
Assim, foi mantido apenas o NTC como controle de contaminação da reação, conforme as diretrizes MIQE (BUSTIN, 2024), garantindo a confiabilidade técnica e a continuidade dos experimentos.

4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE REAÇÃO DA qPCR

A etapa de otimização da concentração dos primers é fundamental para garantir o desempenho adequado de uma reação de qPCR, especialmente em ensaios voltados à detecção de alvos com baixa carga parasitária, como é o caso de *L. (L.) chagasi* em amostras diluídas. A concentração ideal de primers, sonda e diluição ideal do controle positivo deve promover amplificação eficiente, reprodutível e, sobretudo, específica - evitando amplificações inespecíficas, ruídos ou contaminações que possam comprometer os resultados. Essa abordagem é recomendada pela literatura como método padrão para otimização de qPCR (BUSTIN, 2024; TAYLOR *et al.*, 2019).

Para determinar qual concentração ideal de primer (tanto *foward* quanto *reverse*) foi realizado o teste da matriz de sonda com as concentrações: 1000nM, 900nM, 700nM, 500nM, 200nM. O gráfico abaixo (Figura 12) é o resultado de uma qPCR, que demonstra a amplificação da carga parasitária, através da fluorescência conforme a quantidade de ciclos realizados. Foram testados em duplicata, os controles positivos (MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará, proveniente de cão (*Canis familiaris*). Foi utilizado como controle negtaivo o NTC, *template*, no qual leva somente água ultrapura.

Figura 12 - Gráfico de amplificação de qPCR da matriz de primer - Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*;

CP[1] - Controle Positivo - MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

Durante a matriz de primers (Figura 12; Tabela 5), todas as concentrações testadas apresentaram amplificação consistente da cepa controle *L. (L.) chagasi* (M27840), com valores de Cq variando entre 29,93 e 30,86. O NTC (controle sem *template*) foi negativo em todas as condições, descartando contaminação ou formação de produtos inespecíficos.

Tabela 5 - Amplificação de qPCR da matriz de primer

Concetração Primer (*Leish-1/ Leish-2*)	**Concentração Sonda**	**Amostra testadas**	**Média do Cq (ΔRn)**
1000 nM de *foward* para 1000 nM de *reverse*	200 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	29,93
900 nM de *foward* para 900 nM de *reverse*	200 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	30,35
700 nM de *foward* para 700 nM de *reverse*	200 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	30,86
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	**200 nM**	**NTC (controle sem *template* + água ultrapura)***	**Sem Cq**
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	**30,36**
200 nM de *foward* para 200 nM de *reverse*	200 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	30,22

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

*Amostras testadas em duplicatas.

Para avaliar às diferentes concentrações dos primers, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk (p = 0,4777), indicando distribuição normal dos dados. Isso permitiu o uso de testes estatísticos paramétricos mais robustos.

Em seguida, foi realizada uma ANOVA de um critério (One-Way ANOVA), a fim de comparar os valores médios de Cq entre as concentrações de primers. O resultado (p = 0,8077) indicou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, confirmando que todas as concentrações testadas foram igualmente eficazes na amplificação do alvo. Esses dados reforçam a robustez do sistema de qPCR e sua baixa dependência de variações na concentração

dos primers, conforme recomendado pelas diretrizes MIQE (BUSTIN, 2024).

Além disso, foi realizada a análise de repetibilidade por meio do coeficiente de variação (CV%), que mede a precisão entre as duplicatas de cada concentração (AYRES *et al.*, 2007). A análise de repetibilidade também demonstrou alta precisão, com CV% entre duplicatas inferior a 5% para todas as concentrações (variando de 1,72% a 3,63%), atendendo aos critérios de qualidade preconizados para qPCR (BROEDERS *et al.*, 2014; BUSTIN *et al.*, 2009).

Adicionalmente a isso, nenhuma das concentrações induziu amplificação no NTC, incluindo a mais alta (1000 nM), o que indica ausência de formação de artefatos como dímeros de primers. No entanto, concentrações elevadas podem aumentar o risco de ruídos em ensaios futuros, especialmente em matrizes biológicas mais complexas (TAYLOR *et al.*, 2019).

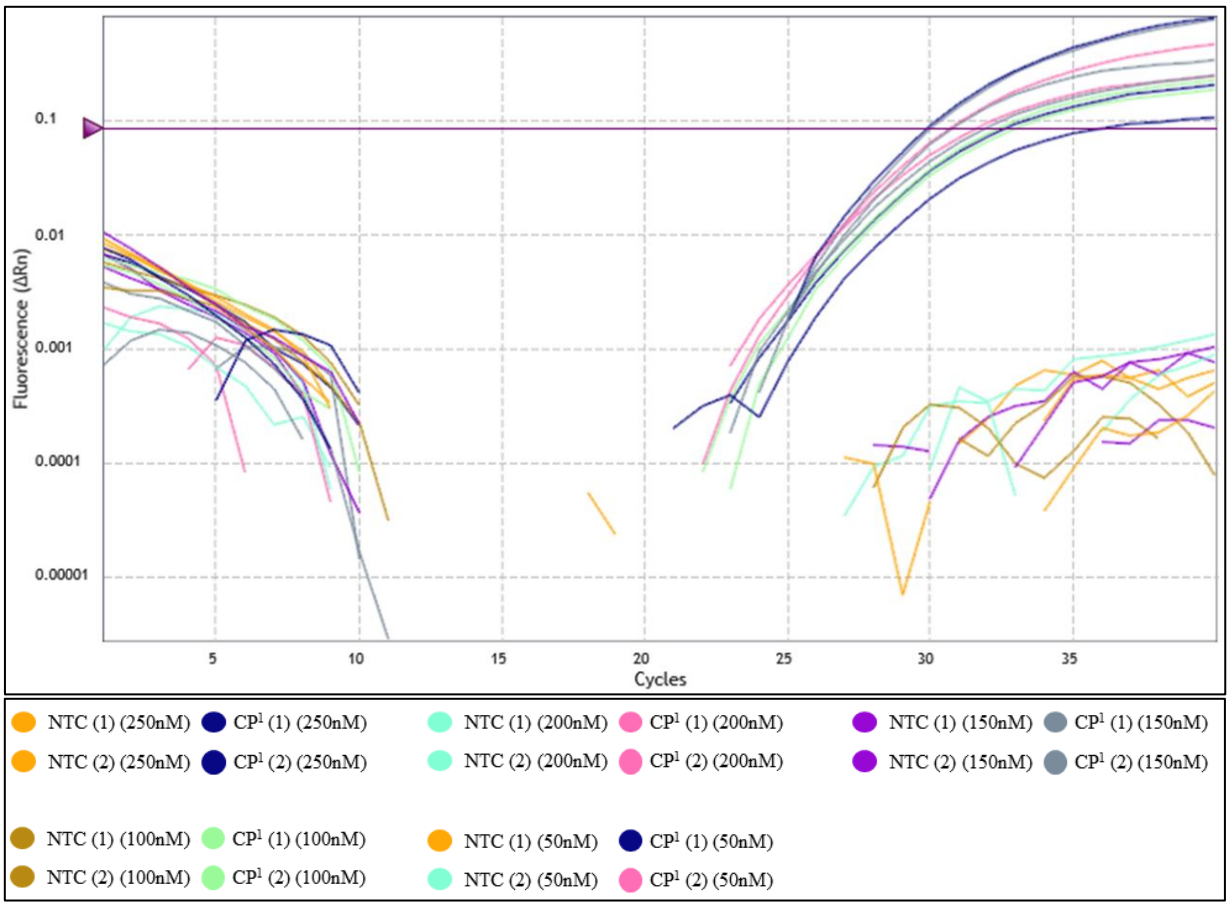
Com base na combinação entre desempenho técnico, economia de reagentes e segurança metodológica, a concentração de 500 nM foi considerada a mais adequada. Essa condição apresentou valor de Cq (30,36) compatível com as demais, garantindo sensibilidade, precisão, ausência de artefatos e melhor relação custo-benefício. Além disso, está em conformidade com as diretrizes MIQE, que recomendam priorizar a menor concentração eficaz de oligonucleotídeos para aumentar a reprodutibilidade e reduzir riscos técnicos (BUSTIN, 2024; BUSTIN *et al.*, 2009).

Assim, definiu-se a concentração de 500 nM para os primers Leish-1 e Leish-2 como padrão para as etapas seguintes do estudo.

A otimização da concentração da sonda é uma etapa fundamental para garantir a máxima eficiência e especificidade de ensaios de qPCR que utilizam o sistema TaqMan®. A concentração inadequada da sonda pode impactar diretamente a fluorescência gerada durante a amplificação, afetando a sensibilidade do ensaio e a confiabilidade dos resultados (BUSTIN, 2024; TAYLOR *et al.*, 2019).

Para determinar qual concentração ideal de sonda, foi realizado o teste da matriz de sonda, no qual testou diferentes concentrações: 250nM, 200nM, 150nM, 100nM, 50nM. O gráfico (Figura 14) é o resultado de uma qPCR, que demonstra a amplificação da carga parasitária, através da fluorescência conforme a quantidade de ciclos realizados. Foram testados em duplicata, os controles positivos (MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará, proveniente de cão (*Canis familiaris*) e o NTC, *template* que leva somente água ultrapura, como controle negativo do teste.

Figura 13 – Gráfico de amplificação de qPCR da matriz de sonda - Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*;

CP[1] - Controle Positivo - MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

A matriz de concentração da sonda TaqMan® apresentou resultados consistentes em todas as condições testadas (Tabela 6; Figura 13). Os valores de Cq variaram entre 31,08 e 33,68, com ausência de amplificação no NTC em todas as concentrações, evidenciando ausência de contaminação ou formação de produtos inespecíficos.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk (p = 0,1828) confirmou que os dados apresentaram distribuição normal, permitindo a aplicação da ANOVA de um critério. O resultado (p = 0,6516) indicou que não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de Cq nas diferentes concentrações, demonstrando que todas foram eficazes na detecção do alvo.

A repetibilidade foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV%). As concentrações de 100 nM, 150 nM e 200 nM apresentaram CVs abaixo de 5% (1,35%, 4,39% e 2,17%, respectivamente), indicando alta precisão. Em contraste, 250 nM (CV = 6,36%) e 50 nM (CV = 11,76%) demonstraram maior variabilidade, sendo consideradas inadequadas para

uso posterior (AYRES *et al.*, 2007).

Tabela 6 - Resultados Matriz de Sonda

Concetração Primer (*Leish-1/ Leish-2*)	**Concentração Sonda**	**Amostra testadas**	**Média do Cq (ΔRn)**
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	250 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	31,38
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	**200 nM**	**NTC (controle sem *template* + água ultrapura)***	**Sem Cq**
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	**31,25**
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	150 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	31,08
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	100 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	32,84
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	50 nM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)*	33,68

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

*Amostras testadas em duplicatas.

Dentre as concentrações testadas, 200nM foi selecionada como ideal por apresentar Cq de 31,25 — um dos menores valores entre as condições —, aliando sensibilidade, precisão, menor consumo de reagentes e as análises principalmente entre os CV% (2,17%,) que demonstraram que está concentração era a ideal entre as testadas. Essa escolha está em

conformidade com as diretrizes MIQE, que recomendam utilizar a menor concentração eficaz possível para otimizar custo-benefício e minimizar riscos de artefatos (BUSTIN, 2024; BROEDERS *et al*., 2014). Além disso, concentrações mais baixas, como 100 nM e 50 nM, apresentaram uma tendência de aumento do Cq (32,84 e 33,68, respectivamente), o que, embora tecnicamente aceitável, indica uma leve perda na eficiência de detecção, especialmente relevante quando aplicadas a matrizes biológicas mais complexas ou com baixa carga parasitária (DE ASSIS *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2018).

Assim, definiu-se a concentração de 200nM como padrão para a sonda TaqMan®, garantindo um sistema de qPCR sensível, preciso e adequado para a detecção do DNA de *L. (L.) chagasi* em soros caninos e silvestres, mesmo em situações de baixa carga parasitária.

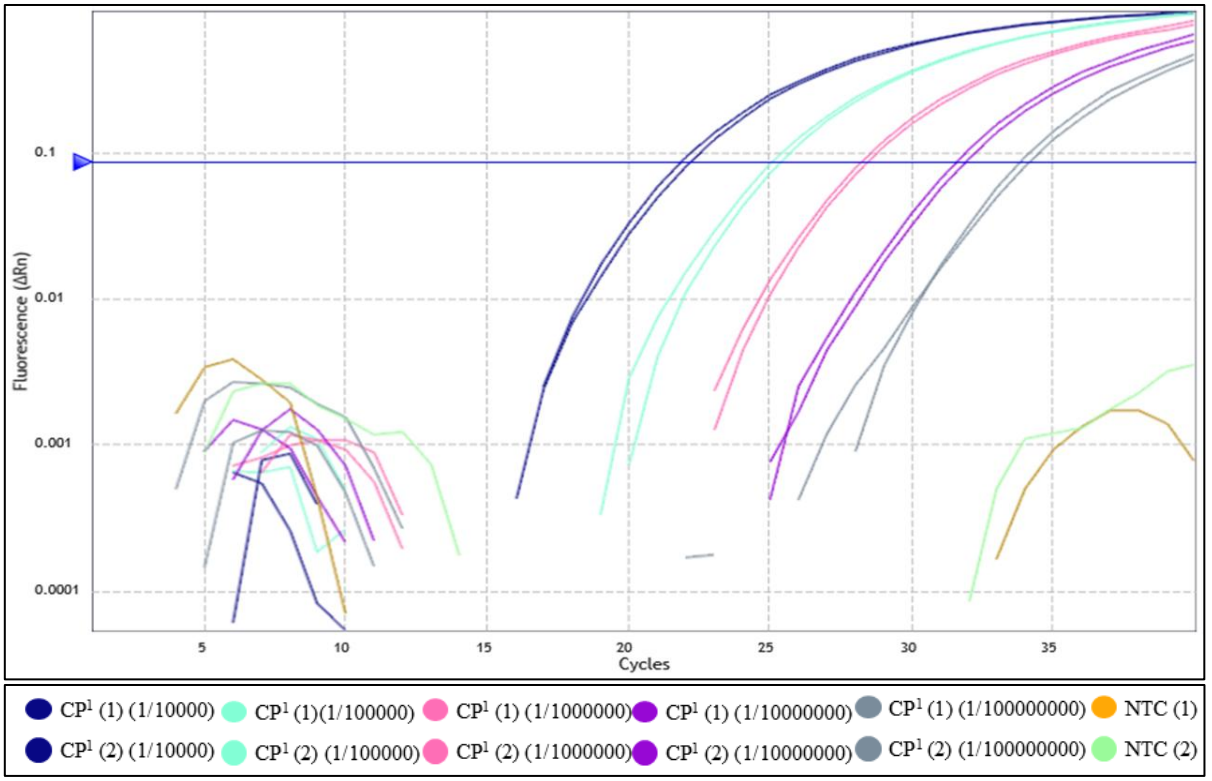
A construção da curva de diluição seriada é uma etapa fundamental na padronização de protocolos de qPCR, pois permite avaliar o desempenho analítico do ensaio em termos de sensibilidade, linearidade e reprodutibilidade (BROEDERS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2021).

Para esta etapa, utilizou-se a mesma cepa *L. (L.) chagasi* (MCAO/BR/2010/M27840), previamente validada, para gerar diluições decimais seriadas de $1/10^4$ a $1/10^8$. As amostras foram testadas em duplicata, utilizando primers Leish-1/Leish-2 a 500 nM, sonda a 200 nM e NTC como controle negativo.

As curvas de amplificação (Figura 14) mostraram perfis típicos, com separação progressiva dos Cq conforme a diluição. A curva padrão (Figura 16) apresentou excelente linearidade entre o log da concentração e os valores de Cq, com $R^2 = 0,996$, confirmando reprodutibilidade entre as duplicatas e bom ajuste do modelo. Segundo as diretrizes MIQE (BUSTIN *et al.*, 2009), esse coeficiente é considerado ideal para validação de ensaios quantitativos.

A eficiência da reação foi de 110,4%, com slope de -3,035, valor ligeiramente acima da faixa ideal (90–110%), porém ainda aceitável, especialmente em amostras com DNA de alta qualidade. Essa leve variação não compromete a confiabilidade dos resultados. De acordo com KUBISTA *et al.* (2006), reações com eficiência entre 80% e 120% ainda podem ser consideradas válidas, desde que os controles sejam consistentes e os dados sejam reprodutíveis, como verificado nesta etapa. Esses parâmetros confirmam a adequação do ensaio para detecção quantitativa do DNA de *L. (L.) chagasi* (TAYLOR *et al.*, 2019).

Figura 14 - Gráfico de amplificação de qPCR com diferentes diluições do controle positivo- Fluorescência x Ciclos.

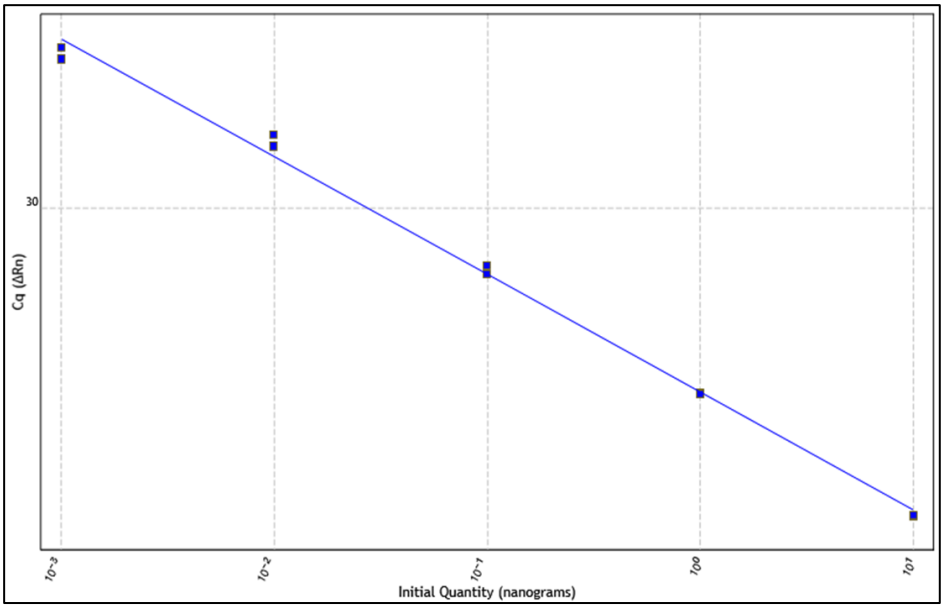


Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*;

CP[1] - Controle Positivo - MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

Figura 15 - Curva padrão construída a partir de padrões de DNA do controle positivo - Cq x nanogramas.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

Como mostra a tabela 7, os valores médios de Cq aumentaram progressivamente com a diluição, de 21,91 ($1/10^4$) até 34,06 ($1/10^8$), estabelecendo o limite de detecção (LOD) do ensaio em Cq aproximadamente 34. Essa sensibilidade está de acordo com estudos prévios sobre alvos kDNA de *Leishmania*, que destacam a capacidade desses sistemas em detectar parasitas mesmo em baixas concentrações (CECCARELLI *et al.*, 2014; FRANCINO *et al.*, 2006).

A faixa linear ficou definida entre $1/10^4$ e $1/10^8$, permitindo quantificação precisa do DNA alvo em ampla variação de cargas parasitárias — essencial para análise de soros de animais assintomáticos ou silvestres (MARY et al., 2004; ZHANG et al., 2021).

Tabela 7 - Curva de diluição do controle positivo.

Concetração Primer (*Leish-1/ Leish-2*)	**Concentração Sonda**	**Amostra testadas**	**Diluição**	**Média do Cq (ΔRn)**	**R^2(ΔRn)**	**Slope(ΔRn)**	**Eficiência (%)**
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	200 nM	Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)	1/10.000*	21,91	0,996	-3,035	110,4
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	200 nM	Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)	1/100.000*	25,11	0,996	-3,035	110,4
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	**200 nM**	**Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)**	**1/1.000.000***	**28,38**	**0,996**	**-3,035**	**110,4**
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	200 nM	Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)	1/10.000.000*	31,77	0,996	-3,035	110,4
500 nM de *foward* para 500 nM de *reverse*	200 nM	Cultura 27840 (*L. (L.) chagasi*)	1/100.000.000*	34,06	0,996	-3,035	110,4

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

*Amostras testadas em duplicatas.

A análise estatística confirmou a consistência dos dados. O teste de Shapiro-Wilk (p =

0,03709) indicou que os dados não seguem distribuição normal. Assim, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, que não apontou diferença estatisticamente significativa entre as diluições (p = 0,0683), validando a escolha da diluição de $1/10^6$ como representativa da faixa linear.

Entre as diluições, a de $1/10^6$ (Cq médio = 28,38) foi escolhida como ponto de referência para os ensaios subsequentes. Este valor se encontra no centro da curva, garantindo amplificação na fase exponencial e reduzindo riscos de saturação ou de variabilidade associada ao limite de detecção (BROEDERS *et al.*, 2014; KUBISTA *et al.*, 2006; MARY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2021). Em síntese, a curva padrão demonstrou que o ensaio de qPCR padronizado é sensível, específico e reprodutível, com alta eficiência e ampla faixa de detecção.

4.3. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO de qPCR

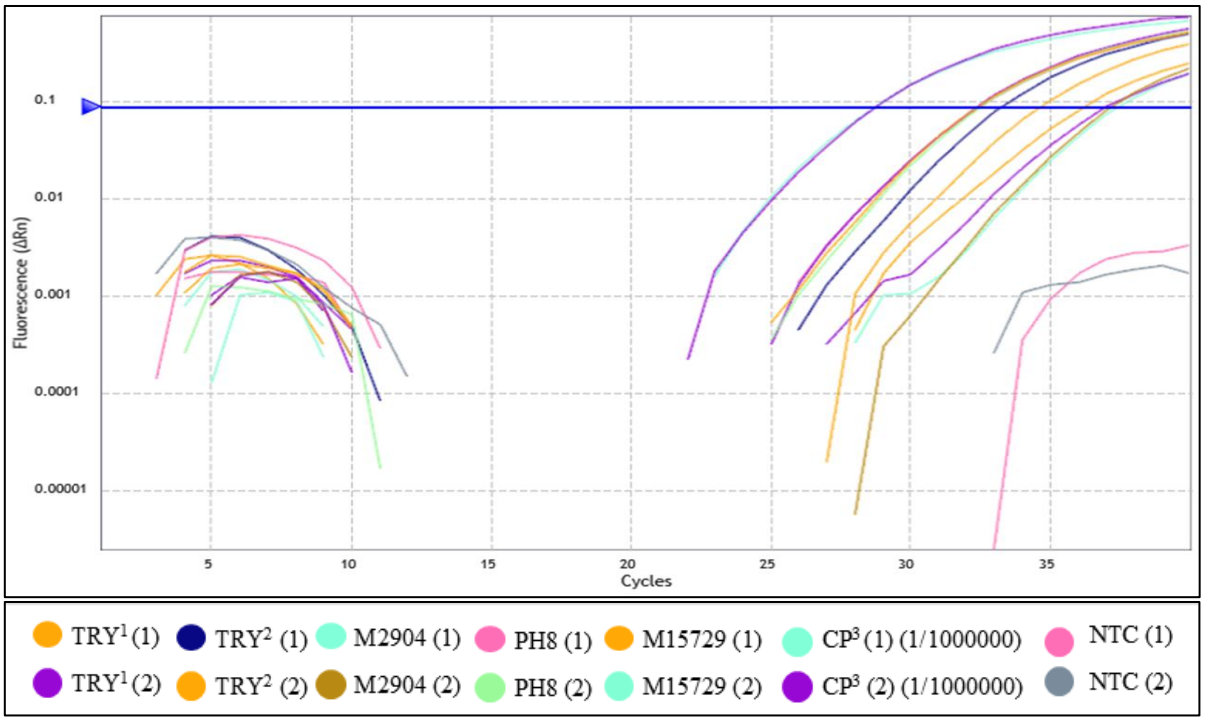
A avaliação da especificidade analítica é fundamental em protocolos de qPCR voltados ao diagnóstico molecular, pois verifica se os primers e a sonda utilizados detectam exclusivamente o DNA do agente alvo — neste caso, L. (L.) chagasi, causadora da leishmaniose visceral americana (LVA) — frente a outras espécies do mesmo gênero ou organismos filogeneticamente relacionados (BROEDERS *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2023).

Para isso, realizou-se um teste de especificidade com DNA de diferentes espécies de Leishmania (PH8, M2904, M15729) e Trypanosoma sp. (M34432 e M34439), testadas em duplicata com primers Leish-1/Leish-2 a 500 nM e sonda a 200 nM. O NTC, contendo apenas água ultrapura, foi utilizado como controle negativo.

Como mostrado na figura 17 e tabela 8, todas as amostras não alvo apresentaram amplificação, com Cq variando de 28,78 a 37,38, o que caracteriza amplificação inespecífica. Esse resultado é incompatível com a especificidade esperada, especialmente para espécies fora do complexo *L. donovani*, que são o alvo primário dos primers testados (FERNANDES *et al.*, 2019; FRANCINO *et al.*, 2006).

Para avaliar se existia diferença estatística nos valores de Cq entre o DNA alvo (*L. (L.) chagasi*) e os DNA não alvo (outras espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* sp.), foram aplicados testes estatísticos. O teste de Shapiro-Wilk indicou distribuição não normal dos dados (p = 0,02239), levando à aplicação do teste de Kruskal-Wallis, cujo valor de p = 0,0562 indica ausência de diferença estatística significativa entre os Cq dos DNAs alvo e não alvo. Isso reforça a falha do sistema em discriminar *L. (L.) chagasi* de outras espécies testadas.

Figura 16 - Gráfico de amplificação de qPCR do teste analítico de especificidade.- Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*);

CP - Controle Positivo: [1]MROD/BR/2022/M34432;

[2]MROD/BR/2022/M34439;

[3]MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará;

MHOM/BR/1996/M15729;

IFLA/BR/1967/PH8;

MHOM/BR/1975/M2904.

Tabela 8 - Teste analítico de especificidade da reação de qPCR.

Concetração Primer (*Leish-1/ Leish-2*)	**Concentração Sonda**	**Amostra testadas**	**Média do Cq (ΔRn)**
0,5 µM de *foward* para 0,5 µM de *reverse*	0,2 µM	NTC (controle sem *template* + água ultrapura)*	Sem Cq
		Controle Positivo (Cultura 27840 - *L. (L.) chagasi*)*	28,78
		Cultura 34432 (TRY)*	36,68
		Cultura 34439 (TRY)*	34,01
		Cultura 2904 (*L. (V.) braziliensis*)*	37,38
		Cultura PH8 (*L. (L.) amazonensis*)*	32,56
		Cultura 15729 (*L. (V.) lindenbergui*)*	32,44

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

*Amostras testadas em duplicatas.

A ausência de amplificação no NTC descarta contaminação, indicando que a reação foi conduzida de forma tecnicamente adequada. Assim, os sinais observados em espécies não alvo apontam para limitações na especificidade dos próprios oligonucleotídeos — hipótese já levantada anteriormente (tópico 4.1).

Embora os primers Leish-1 e Leish-2 sejam amplamente utilizados na literatura, por se basearem na região do kDNA, apresentam potencial para reações cruzadas com outras espécies do subgênero *Leishmania*, como *L. (L.) amazonensis*, devido à alta conservação dessa região (KOCHER *et al.*, 2018; MARY *et al.*, 2004; NICOLAS *et al.*, 2002). A sonda, se mal posicionada ou com baixa especificidade, pode intensificar essa limitação.

Houve a amplificação dos isolados de *Trypanosoma* sp. (M34432 e M34439), entretanto apesar de pertencerem a outro gênero, compartilham características mitocondriais conservadas, como o kDNA. Estudos anteriores já apontam para a possibilidade de reações cruzadas com primers desenhados para *Leishmania,* especialmente em regiões de minicírculos (LACHAUD *et al.*, 2002; VALE *et al.*, 2009).

As reações cruzadas observadas têm implicações diretas para o diagnóstico em campo.

Em áreas endêmicas, onde diferentes espécies de *Leishmania* podem coexistir e outras infecções por *Trypanosomatidae* são comuns, a detecção inespecífica pode resultar em falsos positivos (MARITATI *et al.*, 2023). Isso compromete não apenas o diagnóstico individual, mas também a vigilância epidemiológica, afetando o mapeamento correto das espécies circulantes e a tomada de decisões clínicas e sanitárias. Além disso, a presença de DNA de outras espécies em amostras de cães ou animais silvestres pode levar à superestimação da prevalência de *L. (L.) chagasi*, distorcendo estratégias de controle e manejo da leishmaniose visceral (CARVALHO *et al.*, 2020).

Dessa forma, os resultados indicam que, embora o sistema testado seja sensível, não apresenta especificidade suficiente para diferenciar com precisão *L. (L.) chagasi* de outras espécies de *Leishmania ou de Trypanosoma*, comprometendo sua aplicação em áreas endêmicas com múltiplas espécies circulantes ou para diagnóstico diferencial. Recomenda-se, portanto, o desenho dos primers e da sonda (HOSPINAL-SANTIANI *et al.*, 2023; LEÓN *et al.*, 2017; MOLINA DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; WEIRATHER *et al.*, 2011).

No entanto, a realização deste teste foi essencial para cumprir os objetivos de padronização da técnica antes da aplicação em amostras de cães domésticos e animais silvestres, e para determinação do limite de detecção do sistema.

4.4. AVALIAÇÃO DOS SOROS DE CÃES DOMÉSTICOS E ANIMAIS SILVESTRES - LIMITES DE DETECÇÃO

4.4.1. Ensaio Imunoenzimático - ELISA Indireto

As análises das amostras biológicas (soros) pelas técnicas qPCR (BROEDERS *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2023) e pelo ELISA é de suma importância para o diagnóstico da infecção por *L.* (*L.*) *chagasi*, sendo esta última um método sorológico amplamente empregado em campanhas de controle de LVA (BRAZIL. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA., 2014) que tem como princípio detectar anticorpos circulantes, enquanto a qPCR quantifica o DNA do parasita, sobretudo, em animais com infecção subclínica ou em fase inicial (FARIAS *et al.*, 2020; MARCELINO *et al.*, 2020; PERIS *et al.*, 2021).

Ao analisar as 60 amostras de soros de cães, observou-se que das 30 amostras de soros provenientes de área endêmica de LVA- Barcarena/Pará e RIFI (IgG) positivas (DE JESUS *et al.,* 2016), apresentaram 100% de reatividade pelo ELISA - indireto (IgG). Por outro lado, todos os outros 30 soros caninos de região não endêmica – região metropolitana de Belém e RIFI

(IgG) negativas foram não reagentes pelo ELISA - indireto (IgG) (DE JESUS *et al.,* 2016) (Tabela 9).

Das 25 amostras de soros de animais silvestres, de região endêmica de LVA, também foi realizado o ELISA - indireto (IgG), sendo que 36% foram positivas (9/25) e 64% foram negativas (16/25) (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres pelo ELISA-indireto (IgG)

Amostras	Amostras (N)	Área/RIFI	Positivo (%)	Negativo (%)
Cães Domésticos	60	Endêmica (RIFI IgG +)	30/30 (100%)	0/30 (0%)
		Não endêmica (RIFI IgG -)	0/30 (0%)	30/30 (100%)
Animais Silvestre	25	Endêmica	9/25 (36%)	16/25 (64%)

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

Os resultados do ELISA demonstraram excelente desempenho diagnóstico em cães domésticos, com 100% de frequência tanto nas amostras positivas de região endêmica quanto nas negativas de região não endêmica. Esse desempenho está alinhado com a ampla utilização do ELISA em campanhas de controle, sendo considerado um teste sensível, específico e de fácil aplicação em larga escala para a leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2014; FARIAS *et al.*, 2020). No entanto, para animais silvestres, a frequência de positividade foi de apenas 36%, indicando limitações já reconhecidas na literatura, uma vez que a detecção de anticorpos pode ser afetada pela variabilidade da resposta imune entre diferentes espécies ou por infecções subclínicas (RIHS *et al.*, 2025b).

4.4.2. Avaliação dos soros de cães domésticos e animais silvestres pelo método molecular (qPCR)

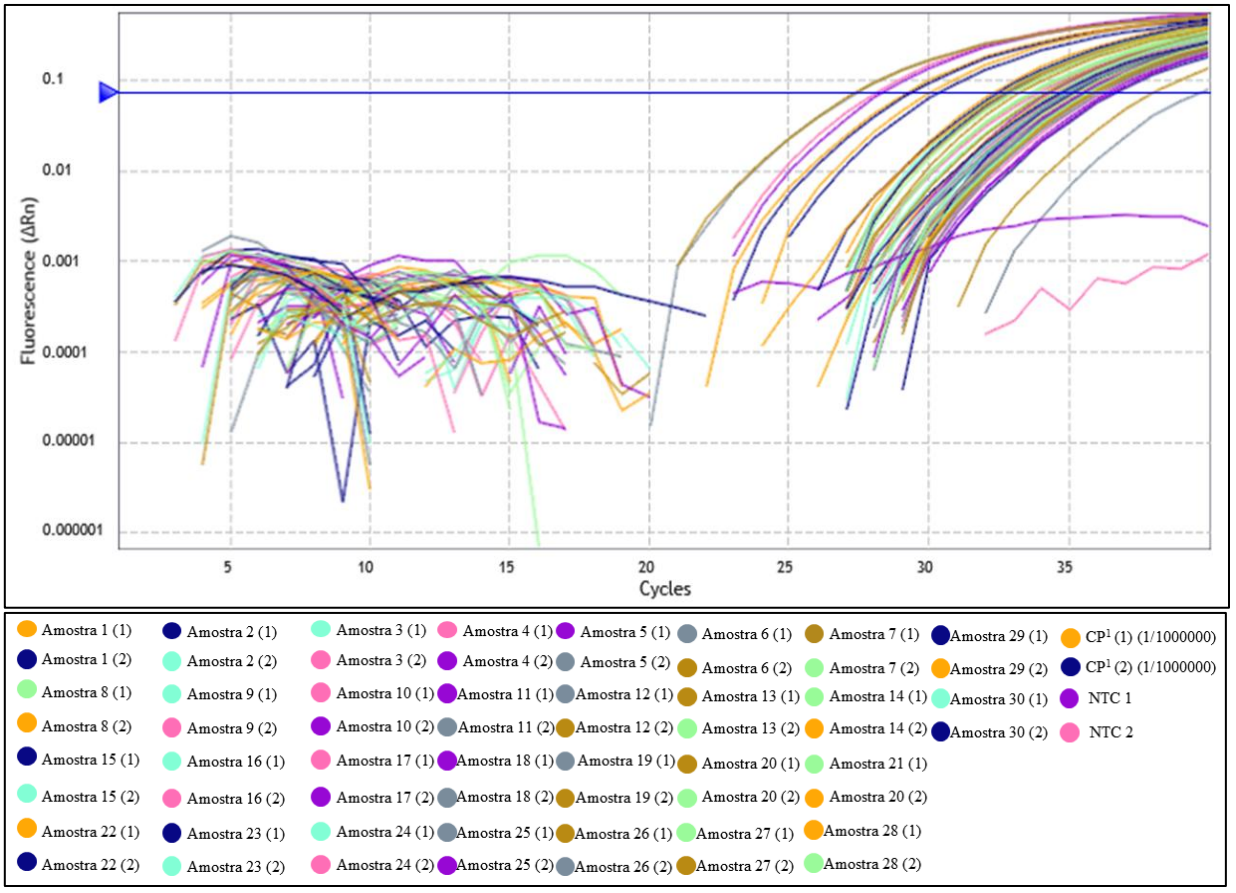
As 85 amostras de soros (60 soros caninos e 25 animais silvestres) foram analisadas pelo ELISA - indireto (IgG) foram também examinadas pela qPCR, em duplicata, com concentrações de primers Leish-1/Leish-2 a 500nM (0,5µM) e sonda a 200nM (0,2µM). Para controle positivo foi utilizado (MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará, proveniente de cão doméstico - *Canis familiaris*), com diluição de 1/1.000.000. E o soro controle negativo não foi utilizado sendo empregado apenas o NTC (*template* com água ultrapura) como controle negativo da reação.

Com relação ao teste de sensibilidade, todas as 30 amostras de cães positivas por ELISA

indireto (IgG) foram também positivas por qPCR, com valores de Cq variando entre 22,95 e 34,18. A média do Cq para o controle positivo (da cepa) foi de 24,94, dentro da faixa esperada para amostra com diferente carga parasitária. Essa concordância entre os dois testes indica alta sensibilidade do ensaio molecular de qPCR, já que não houve nenhum falso negativo detectado, ou seja, a sensibilidade da qPCR foi de 100% (Figura 17 e ANEXO D).

A detecção de DNA parasitário em todos os soros positivos demonstra a eficácia da qPCR mesmo em uma matriz de difícil amplificação como o soro. Estudos como os de CASTELLI *et al.* (2021); DE GODOY *et al.* (2020) e TRAVI *et al.* (2018), já haviam relatado a eficácia dos testes moleculares na detecção da infecção em cães soropositivos, especialmente em casos em que a carga parasitária é baixa, mas ainda detectável por qPCR.

Figura 17 - Gráfico de amplificação de qPCR do teste de sensibilidade - Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*;

CP - Controle Positivo [1]MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

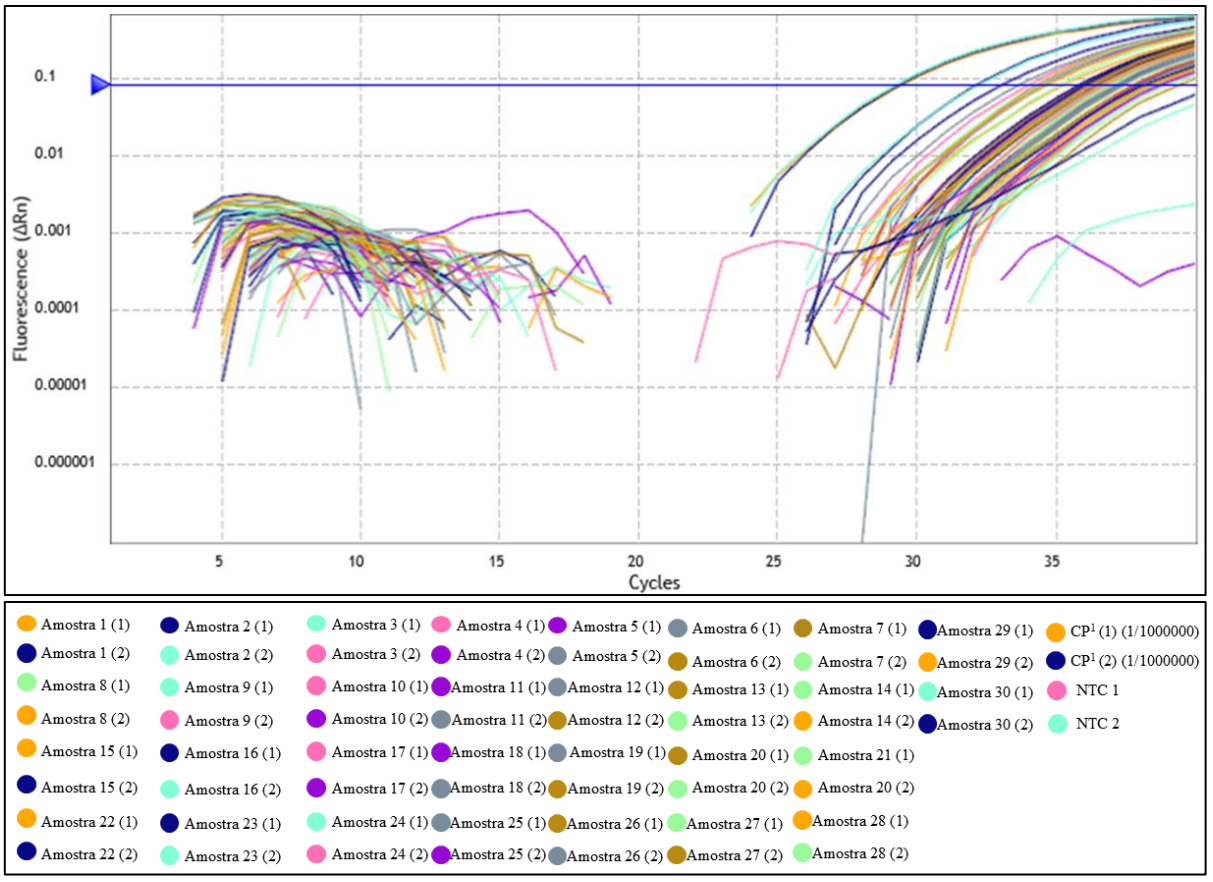
Dos 30 soros de cães negativos por ELISA indireto (IgG), 29 apresentaram amplificação por qPCR (Cq entre 31 e 39), e apenas uma amostra não amplificou (ANEXO D). A figura 18

mostra amplificação em quase todas as amostras, enquanto o controle NTC permaneceu sem fluorescência, descartando contaminação. Esses achados indicam baixa especificidade clínica, confirmada pelo valor de apenas 2,17% obtido no teste de especificidade, o que evidencia a alta taxa de falsos positivos do qPCR.

Esse resultado pode ser explicado por dois fatores. A primeira hipótese considera a natureza dos testes: o ELISA indireto detecta anticorpos, que podem estar ausentes no início da infecção, em animais imunossuprimidos ou com resposta humoral (FARIAS *et al.*, 2020; MARCELINO *et al.*, 2020; PERIS *et al.*, 2021). Por outro lado, o qPCR detecta diretamente o DNA do parasito, sendo mais sensível na identificação da infecção ativa (CECCARELLI *et al.*, 2014; MARY *et al.*, 2004).

A segunda e mais provável hipótese, é a baixa especificidade dos *primers* e/ou da sonda, como já discutido (tópicos 4.1 e 4.3). Oligonucleotídeos mal desenhados podem gerar reações cruzadas com sequências semelhantes do genoma do hospedeiro, de microrganismos comensais ou de contaminantes ambientais, resultando em falsos positivos (BUSTIN *et al.*, 2009; KUBISTA *et al.*, 2006). Além disso, falhas no alinhamento *in sílico* podem não prever todas as regiões homólogas em genomas complexos ou pouco anotados (TAYLOR *et al.*, 2010).

Figura 18 – Gráfico de amplificação de qPCR do teste clínico de especificidade - Fluorescência x Ciclos



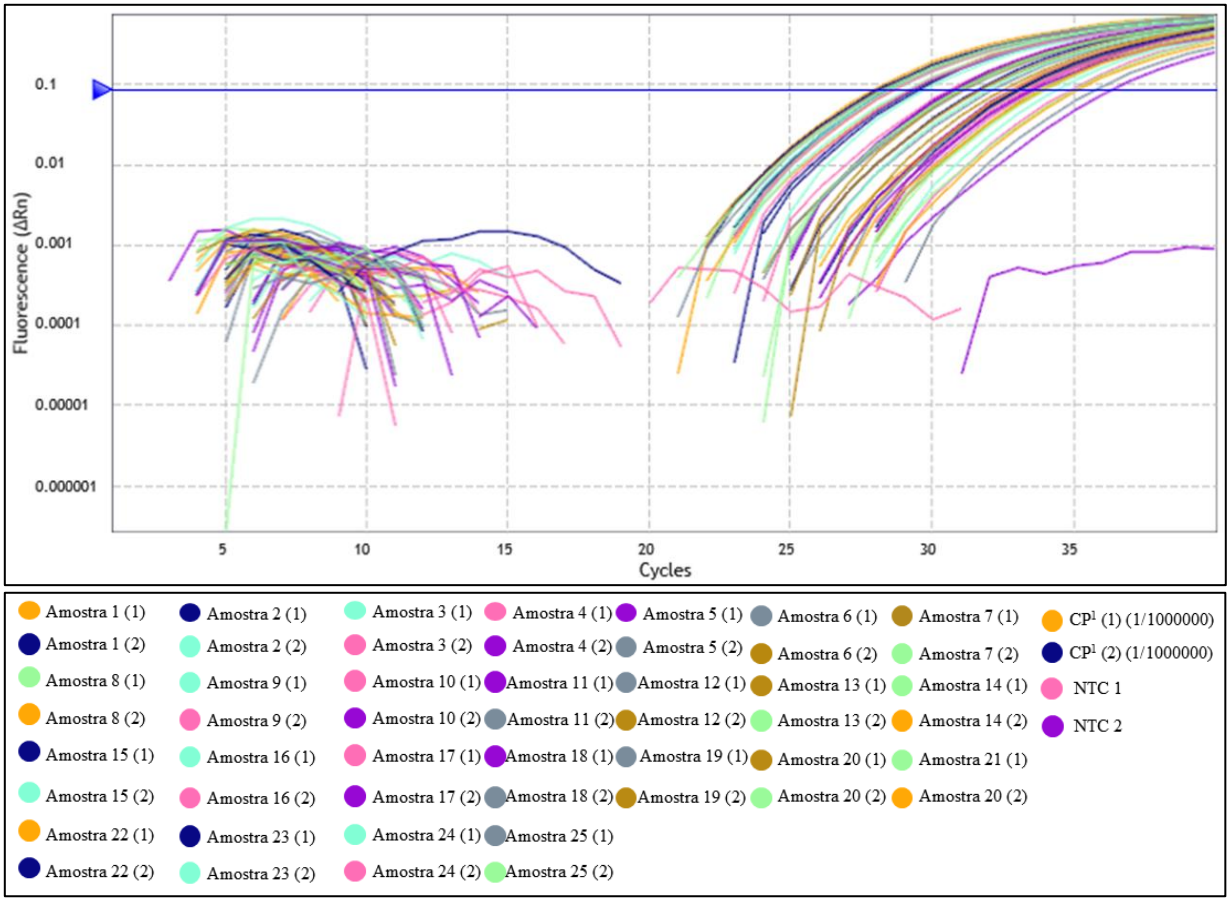
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*);

CP - Controle Positivo [1]MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

A Figura 19 e o ANEXO D evidenciam que todas as 25 amostras de animais silvestres (raposas, marsupiais e roedores) amplificaram por qPCR (Cq entre 27,99 e 36,01), embora apenas 9 delas tenham sido positivas por ELISA-indireto.

Figura 19 - Gráfico de amplificação de qPCR das amostras de animais silvestres - Fluorescência x Ciclos.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

NTC - Controle sem *template*;

CP - Controle Positivo [1]MCAO/BR/2010/M27840/Barcarena-Pará.

Para avaliar a concordância entre o ELISA indireto e o qPCR, foram realizados testes estatísticos complementares. A acurácia observada foi de 47,06%, indicando que menos da metade das amostras teve resultados coincidentes entre os dois métodos. Esse índice foi afetado principalmente pela alta taxa de falsos positivos no qPCR: 29 cães soronegativos pelo ELISA foram positivos no qPCR, assim como todas as 25 amostras de animais silvestres, das quais apenas 9 eram soropositivas.

O valor preditivo positivo (VPP) foi de 46,42%, revelando que mais da metade dos resultados positivos por qPCR não apresentavam anticorpos detectáveis pelo ELISA, comprometendo a confiabilidade desses achados. O F1-score de 63,41% reflete um desempenho moderado, resultado do contraste entre a alta sensibilidade (100%) do qPCR e sua baixa precisão — ou seja, o teste detectou todos os verdadeiros positivos, mas também gerou diversos falso-positivos.

O índice Kappa de Cohen foi de 0,019, indicando concordância mínima entre os

métodos. Isso se deve às naturezas distintas das técnicas: o ELISA detecta a resposta imune do hospedeiro, enquanto o qPCR identifica diretamente o DNA do parasita (FARIAS *et al.*, 2020). Ambos os métodos apresentam vantagens e limitações. O ELISA é mais acessível, econômico e fácil de aplicar, sendo amplamente utilizado em regiões com poucos recursos (MOTTA; EBERT; BATISTA, 2021), mas pode falhar na detecção de infecções recentes ou em animais imunossuprimidos (RIHS *et al.*, 2025b). Já o qPCR, por sua maior sensibilidade, é eficaz na detecção precoce, mas demanda maior infraestrutura, custos elevados e maior complexidade operacional (MUNYSE *et al.*, 2022).

Esses achados, aliados à baixa especificidade clínica (2,17%), apontam para um problema nos oligonucleotídeos utilizados, possivelmente gerando amplificação inespecífica. Diante disso, foi necessário realizar análises bioinformáticas dos *primers* e da sonda utilizados no qPCR, a fim de investigar potenciais falhas no desenho ou reatividade cruzada com outras sequências genômicas.

4.5. ANÁLISE *in silico* DA SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* E DAS SONDAS

A avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos utilizados na qPCR é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados, especialmente no desenvolvimento de métodos diagnósticos de alta precisão, como na detecção de *L. (L.) chagasi* em soro de cães domésticos e animais silvestres (BUSTIN, 2024; TAYLOR *et al.*, 2019).

Para isso, foi adotada uma abordagem integrada: verificação da especificidade por meio do NCBI Primer-BLAST; alinhamento múltiplo com o software MAFFT, a fim de confirmar o posicionamento correto dos primers e da sonda na sequência do minicírculo kDNA; e análise físico-química dos oligonucleotídeos pelo OligoAnalyzer (IDT) (KATOH; ASIMENOS; TOH, 2009; KHAN; CHEUNG, 2020; ZHANG *et al.*, 2025).

Conforme a Tabela 10, os primers Leish-1 e Leish-2 apresentaram 100% de identidade e cobertura com a sequência de referência do minicírculo de L. donovani/infantum (GenBank: MT598578.1), com E-values indicativos de alinhamentos significativos (Leish-1: 0,023; Leish-2: 88). Esses achados sugerem que, ao menos no nível dos *primers*, a amplificação ocorre em regiões conservadas e direcionadas exclusivamente para o complexo *donovani*, o que está de acordo com estudos prévios que validaram esses oligonucleotídeos em contextos clínicos (FRAGA *et al.*, 2010; MARY *et al.*, 2004).

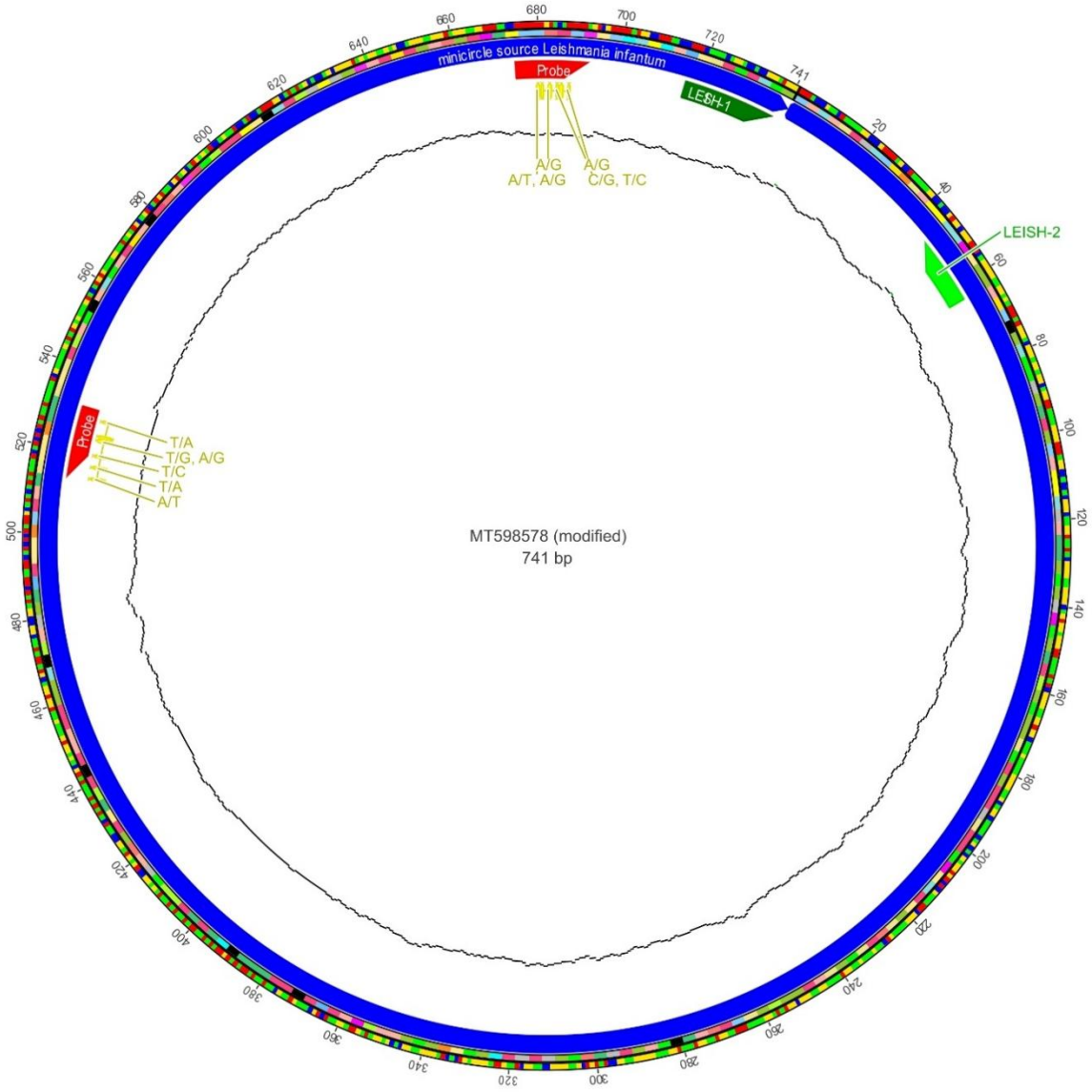
Tabela 10 – Alinhamento das sequências de *primers* e da sonda

Parâmetro	***Primer Foward* (Leish-1)**	***Primer Reverse* (Leish-2)**	***TaqMan®-MGB Probe* (Sonda)**
Query	Leish-1	Leish-2	Probe TaqMan®
Sequence ID (Subject)	MT598578.1	MT598578.1	MT598578.1
Organismo	*L. donovani* /*infantum*	*L. donovani* /infantum	*L. donovani* /infant*um*
% Identidade (Identity)	100%	100%	-
Cobertura da Query (Q. cover)	100%	100%	-
Score (Bit score)	46,1	34,2	-
E-value	0,023	88	-
Alinhamento (Start-End)	Start-717/ End-739	Star: 63 / End-47	-
Alvo esperado (Sim/ Não)	Sim	Sim	Não

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no Primer- BLAST NCBI.

Em contraste, a sonda TaqMan®-MGB Probe, embora vinculada à mesma sequência de referência, não exibiu dados de identidade, cobertura ou score no NCBI Primer-BLAST, sendo classificada como “Não” para alvo esperado. Isso sugere falha na hibridização, reforçada pelos dados gráficos de alinhamento (Figura 20), que mostram a sonda fora da região delimitada pelos primers e com vários polimorfismos (SNPs), destacados em amarelo. Tal configuração compromete sua eficiência e especificidade durante a qPCR.

Figura 20 - Gráfico alinhamento de sequências de *L. (L.) chagasi* com os *primers* e a sonda.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no programa MAFFT.

A Figura 20 apresenta o mapa circular da sequência alvo (741pb) com o posicionamento dos primers e da sonda. Leish-1 e Leish-2 estavam corretamente orientados e distantes de forma adequada para gerar o *amplicon* previsto. Já a sonda apresentava múltiplos SNPs e estava mal posicionada, fora da região de ancoragem dos primers. A partir do alinhamento com o MAFFT, utilizando tolerância de até seis substituições de bases, foi possível identificar essas variações nucleotídicas. Embora o ideal seja até cinco erros (CONTER et al., 2019; RODRÍGUEZ et al., 2015), a margem ampliada visou aumentar a sensibilidade da análise e detectar polimorfismos relevantes, assegurando que os oligonucleotídeos estivessem ancorados em regiões conservadas

do kDNA (CHICHARRO *et al.*, 2002; MARY *et al.*, 2004; NICOLAS *et al.*, 2002).

Esses achados indicam que as falhas nos ensaios de especificidade não se devem exclusivamente à possível inespecificidade do ELISA, mas à má performance da sonda durante a amplificação. Segundo BUSTIN *et al.* (2009), sondas mal desenhadas ou mal posicionadas podem gerar fluorescência inespecífica, mesmo sem ligação adequada ao DNA-alvo.

A tabela 11 traz as análises físico-químicas dos oligonucleotídeos. Leish-1 (23pb) tem Tm elevado (67,5 °C), dificultando a compatibilidade com Leish-2 (18pb, Tm de 57,5 °C e GC de 33,3%). Já a sonda TaqMan®-MGB Probe (17pb, GC de 70,6%) apresenta Tm de 69,9 °C, muito alta para seu tamanho, favorecendo hibridações inespecíficas. Esse desbalanceamento térmico viola recomendações para qPCR, que indicam que os primers devem ter Tm semelhantes entre si, e a sonda deve possuir Tm de 5 a 10°C acima dos primers (BUSTIN, 2024; KUBISTA et al., 2006). Além disso, houve a formação de estruturas secundárias de: hairpin: 41,1ºC (Leish-1) (Figura 21 - A) e dímeros de primers (Leish-2 e Taqman® MGB Probe) (Figura 22 – A e B). Com relação ao harpin para Leish-1 é descartado sua probalidade de formação, visto que, ocorre em uma temperatura bem abaixo do Tm (67,5 ºC) (BUSTIN et al., 2009). As análises estruturais dos oligonucleotídeos realizadas pelo RNAfold web server indicaram que os *primers* apresentaram baixa propensão à formação de dímeros estáveis, porém a sonda Taqman® MGB Probe mostrou emparelhamento evidente em regiões termodinamicamente mais favoráveis, sugerindo possível risco de interferência nas reações de qPCR (CONTER et al., 2019; RODRÍGUEZ et al., 2015). O descumprimento dessas diretrizes contribui para artefatos e perda de especificidade (CONTER *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

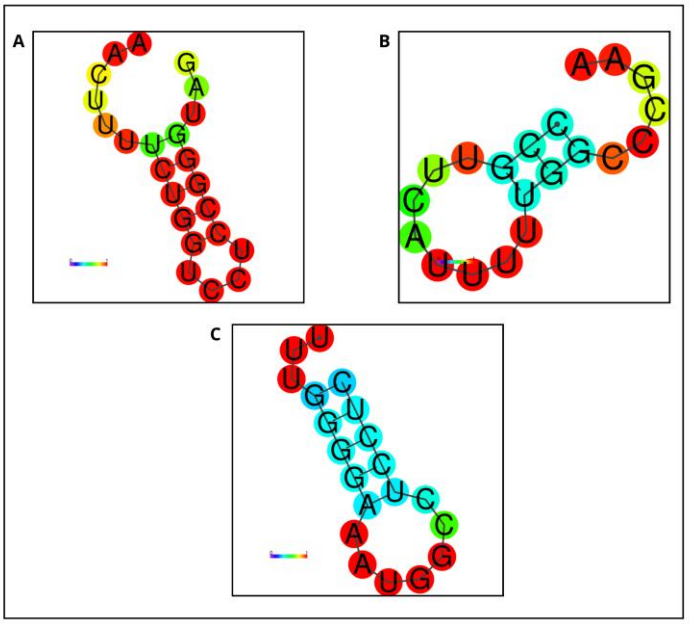
Tabela 11 – Análises Físico-químicas das sequencias dos *Primers e* das Sonda de qPCR

Nome	%GC	Tipo de Oligonucleotídeo	*Hairpin* (ºC)	Tamanho da Sequência	Tm(ºC)
GIO-06F*	50,0 %	*Primer*	28,8	20	59,7
GIO-96P*	55,0 %	*Probe* (Sonda)	33,6	20	60,0
GIO-155R*	55,0 %	*Primer*	-	20	60,3
Leish-1	52,2 %	*Primer*	41,1	23	67,5
TaqMan®-MGB Probe	70,6 %	*Probe* (Sonda)	-	17	69,9
Leish-2	33,3 %	*Primer*	-	18	57,5

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no programa Geneious.

*Sequência sob sigilo.

Figura 21 - Análises secundárias (formação de hairpins)



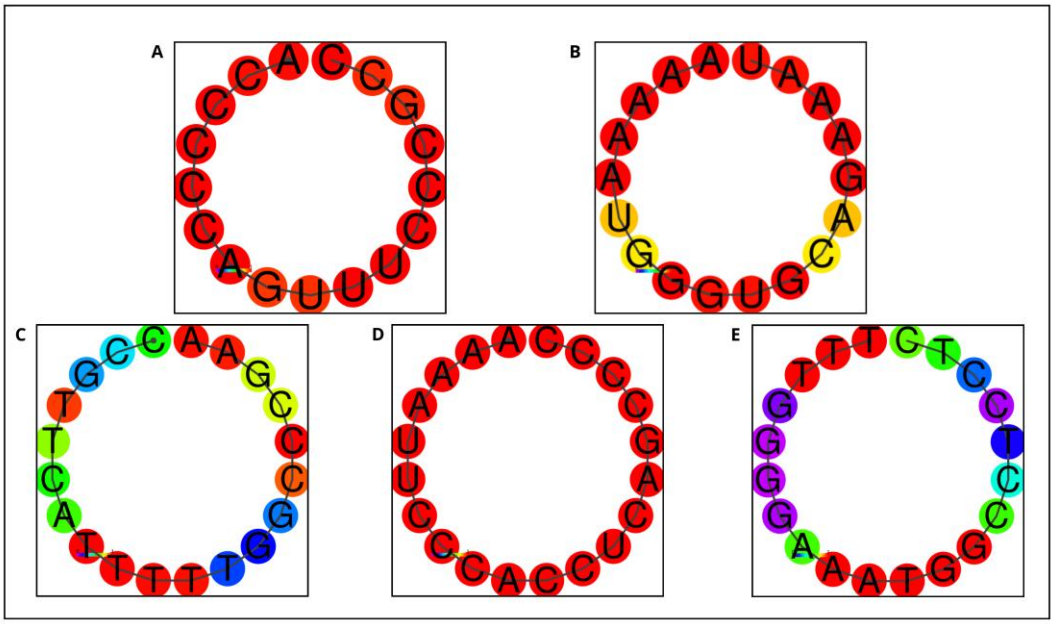
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no programa RNAfold web server.

A. Leish-1

B. GIO-06F

C. GIO-96P

Figura 22 - Estruturas secundárias (dímero de primer)



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no programa RNAfold web server.

A. Leish-2

B. Taqman® MGB Probe

C. GIO-06F

D. GIO-155R

E. GIO-96P

Como solução, foram desenhados novos oligonucleotídeos: GIO-06F, GIO-155R e GIO-96P (Tabela 11), com 20pb cada, Tm entre 59,7°C e 60,3°C, e GC entre 50% e 55%, *hairpin* de 28,8 a 33,6ºC (GIO-06F e GIO-96P) (Figura 21 – B e C) e dímero de *primer* 4ºC (GIO-06F, GIO-155R e GIO-96P) (Figura 22 – C, D e E). As interpretações obtidas para esses resultados são coerentes com a explicação previamente apresentada. Os *primers* não apresentaram formação significativa de dímeros ou estruturas do tipo *hairpin*. A sonda, por sua vez, embora não tenha formado *hairpins*, mostrou alguma formação de dímeros, porém com temperatura de dissociação baixa (4ºC), distinta da sua Tm, o que minimiza seu impacto. A sonda GIO-96P, com Tm de 60 °C, demonstrou melhor compatibilidade com os primers e maior potencial de especificidade, especialmente em amostras com baixa carga parasitária, como as provenientes de animais silvestres (CONTER *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Além disso, a Tm da sonda foi inferior à dos primers, quando o ideal seria que ela fosse de 5 °C a 10 °C maior para garantir sua ligação antes da extensão da polimerase. Para isso, recomenda-se

o uso de sondas TaqMan®-MGB, que, por conterem um ligante de sulco menor (*Minor Groove Binder*), elevam a Tm mesmo em sondas curtas, aumentando a especificidade do pareamento (KUBISTA et al., 2006).

A análise conjunta demonstrou que, apesar da boa especificidade *in silico* dos primers Leish-1 e Leish-2, a sonda TaqMan®-MGB Probe falha em critérios genômicos e físico-químicos essenciais para aplicações diagnósticas. A substituição por oligonucleotídeos otimizados representa uma alternativa promissora para aprimorar a sensibilidade e especificidade do ensaio, viabilizando sua aplicação no diagnóstico molecular de *L. (L.) chagasi* em cães e animais silvestres.

4.5.1. Análise *in sílico* dos novos primers e sonda de qPCR

A escolha adequada dos oligonucleotídeos é essencial para o sucesso da qPCR, exigindo a verificação de suas propriedades físico-químicas, estruturais e de especificidade. Diante das limitações observadas com os oligonucleotídeos Leish-1, Leish-2 e TaqMan®-MGB Probe (FRANCINO *et al.*, 2006), foi necessário desenvolver um novo conjunto: os primers GIO-06F (*forward*), GIO-155R (*reverse*) e a sonda GIO-96P. A validação *in silico* foi realizada por Primer- BLAST NCBI (Tabela 12) e alinhamento genômico no MAFFT.

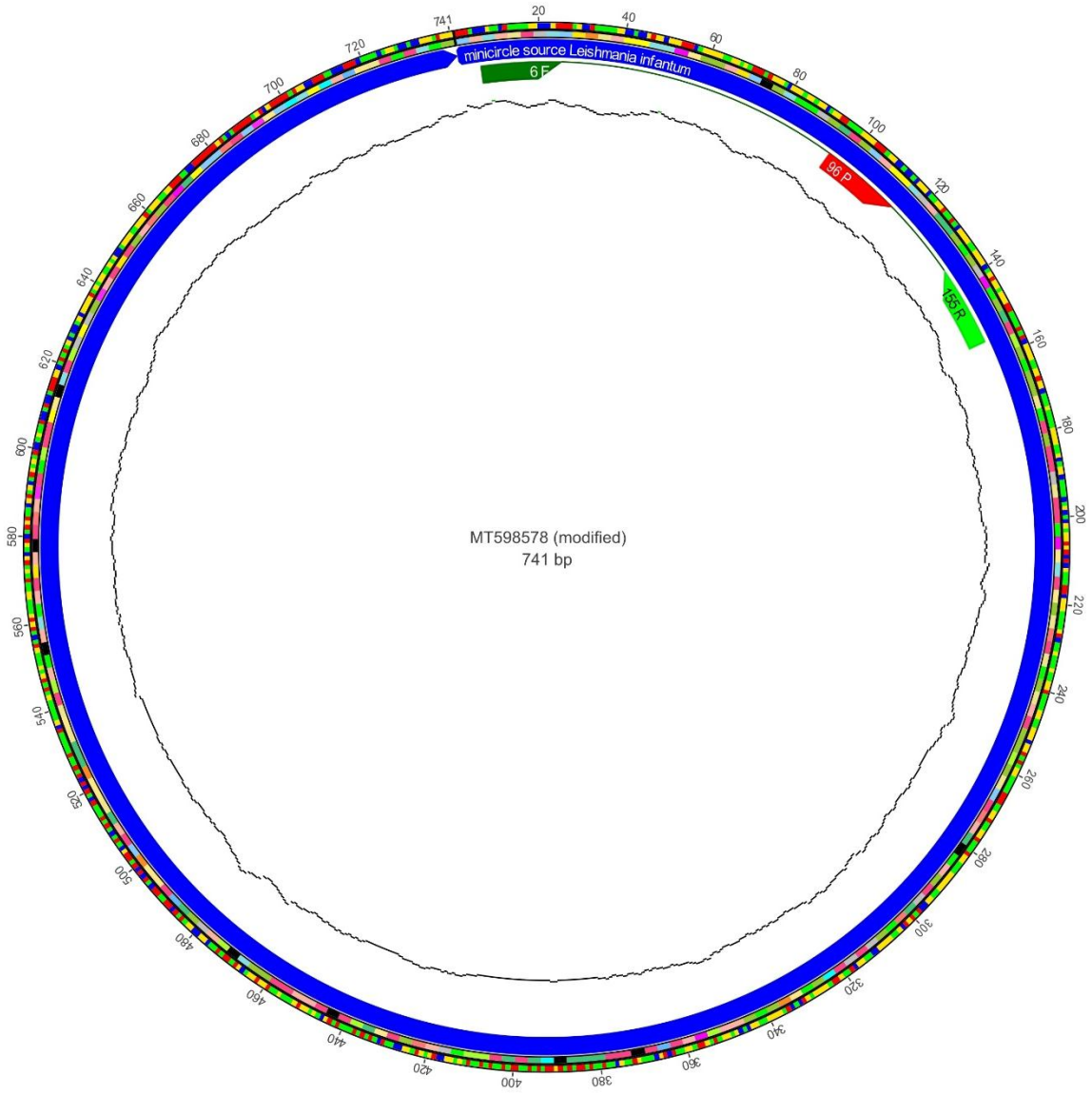
Tabela 12 - Alinhamento das sequências dos novos *primers* e sonda

Parâmetro	***Primer Foward* (GIO-06f)**	***Primer Reverse* (GIO-155R)**	***TaqMan®-MGB Probe* (GIO-96P)**
Query	GIO-06F	GIO-155R	GIO-96P
Sequence ID (Subject)	MT598578.1	MT598578.1	MT598578.1
Organismo	*L. donovani/ infantum*	*L. donovani/ infantum*	*L. donovani/ infantum*
% Identidade (Identity)	100%	100%	100%
Cobertura da Query (Q. cover)	100%	100%	100%
Score (Bit score)	40,1	40,1	40,1
E-value	1,4	1,4	1,4
Alinhamento (Start-End)	Start-06/End-25	Start-155/End-136	Start-96/End-115
Alvo esperado (Sim/ Não)	Sim	Sim	Sim

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no Primer- BLAST NCBI.

Todos os oligonucleotídeos apresentaram alinhamento específico com o minicírculo de Leishmania donovani/infantum (GenBank: MT598578.1), com 100% de identidade e cobertura, corroborado por valores significativos de score e E-value. A validação *in silico* está em conformidade com as diretrizes MIQE, que recomendam a análise prévia da especificidade dos oligonucleotídeos para evitar reações cruzadas (BUSTIN *et al.*, 2009; CONTER *et al.*, 2019)

Figura 23 - Gráfico alinhamento de sequências de *L. (L.) chagasi* com os novos *primers* e a nova sonda.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025. As análises foram realizadas no programa MAFFT.

O mapeamento da sequência-alvo minicírculo de Leishmania infantum (GenBank: MT598578, modificado) no MAFFT, evidenciou o posicionamento ideal dos oligonucleotídeos. O primer GIO-06F inicia na posição 6, e o GIO-155R entre as posições 155–136, formando um

amplicon de aproximadamente 150pb — dentro da faixa ideal para qPCR (70pb – 200pb). A sonda GIO-96P está localizada entre os dois primers (posição 96–115), favorecendo a hibridização antes da extensão pela DNA polimerase, condição essencial para a detecção eficiente do sinal de fluorescência nos ensaios TaqMan® (CONTER *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Essa organização espacial também segue as recomendações técnicas para ensaios de qPCR, segundo as quais a sonda deve se ligar internamente à região do *amplicon,* e possuir uma Tm levemente superior à dos primers para garantir a sua ligação preferencial antes da extensão (KUBISTA et al., 2006)

Esses resultados demonstram que a adoção do conjunto GIO como uma alternativa preditiva, robusta e específica para o diagnóstico molecular de *L. (L.) chagasi* em amostras de soro de cães e animais silvestres, contribuindo para a padronização da técnica em contextos laboratoriais e de vigilância epidemiológica.

5. CONCLUSÃO

Este estudo avançou no desenvolvimento e avaliação de um protocolo de qPCR voltado ao diagnóstico molecular de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em amostras de soro de cães domésticos e animais silvestres provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas do Estado do Pará.

Foram padronizadas as etapas de extração de DNA a partir de soro, e o sistema de qPCR previamente descrito foi otimizado e validado com base em parâmetros técnicos como sensibilidade, eficiência, reprodutibilidade e limite de detecção. No entanto, a aplicação do método a amostras biológicas indicou limitações na especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, com a ocorrência de resultados falso-positivos.

Diante dessa limitação, foi realizado o desenho *in silico* de um novo conjunto de oligonucleotídeos, baseado na região do minicírculo do kDNA, visando aumentar a especificidade do método. Os resultados se mostraram promissores, sugerindo potencial superioridade em relação ao conjunto anteriormente utilizado, sendo necessário testes experimentais para confirmar sua aplicabilidade.

A comparação do desempenho da qPCR com métodos sorológicos (ELISA-indireto e RIFI) reforçou o potencial do método molecular para detectar infecções ativas, especialmente em casos com baixa carga parasitária, demonstrando sua relevância como ferramenta complementar no diagnóstico da leishmaniose visceral.

Assim, os achados deste trabalho contribuem para o aprimoramento de estratégias diagnósticas e reforçam a importância da qPCR como instrumento potencialmente aplicável à vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral na região amazônica, especialmente em contextos que envolvem reservatórios domésticos e silvestres.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRESEN, K.; GASIM, S.; ELHASSAN, A. M.; KHALIL, E. A. G.; BARKER, D. C.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, v. 2, n. 5, p. 440–444, 1 maio 1997. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3156.1997.tb00166.x>. Acesso em: 11 mar. 2024.

ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 191–199, 2008. Disponível em: <https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(08)70043-4/abstract>. Acesso em: 5 mar. 2024.

ARAUJO, F. G.; MAYRINK, W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II. Studies on the specificity of the test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 10, n. 1, p. 41–45, 1968.

ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E. M.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. E202–E264, 2016.

AVELAR, A.; PAIN, M.; DE, L.; ANTONIO, F.; ROTUREAU, B.; MALDONADO-ARONI, M.; ROJAS-PALOMINO, N.; SANDOVAL-JUAREZ, A.; GALARZA-PÉREZ, M.; ALARCÓN-GUERRERO, J.; GUEVARA-MONTERO, R.; CÁRDENAS-LÓPEZ, V. Validation of a Real-Time PCR for the Diagnosis of Leishmania Species Using the Hsp20 Gene. **Tropical Medicine and Infectious Disease 2025, Vol. 10, Page 121**, v. 10, n. 5, p. 121, 1 maio 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2414-6366/10/5/121/htm>. Acesso em: 30 maio. 2025.

AYRES, M.; JR., M. A.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. de A. S. dos. **BIOESTAT 5.0- Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas**. [s.l: s.n.]v. 5°1–381 p.

BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1 dez. 1986a. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/154.6.1003>. Acesso em: 11 mar. 2024.

BADARO, R.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 1, p. 72–78, 1 jan. 1986b. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/3080918>. Acesso em: 11 mar. 2024.

BADARO, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in

American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 480–484, 1 maio 1983. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/6407345>. Acesso em: 11 mar. 2024.

BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; ARM, G.; CMG, D.; MAS, R.; DE JANEIRO, R. EFICIÊNCIA E AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE SÊMEN, SANGUE E PELO EM OVINOS EFFICIENCY AND ECONOMIC ASSESSMENT OF DNA EXTRACTION METHODS FROM OVINE SEMEN, BLOOD AND HAIR Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av Alberto Lamego, 20. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA**, v. 14, n. 2019, p. 117–125, 2019.

BENCHIMOL, J. L. Leishmaniases of the new world from a historical and global perspective, from the 1930s to the 1960s. **Historia, Ciencias, Saude - Manguinhos**, v. 27, p. 95–122, 2020. BITENCOURT, M. M.; BEZERRA, A. M. R. Infection agents of Didelphidae (Didelphimorphia) of Brazil: An underestimated matter in zoonoses research. **Mammalia**, v. 86, n. 2, p. 105–122, 2022.

BORJA, L. S.; SOUSA, O. M. F. de; SOLCÀ, M. da S.; BASTOS, L. A.; BORDONI, M.; MAGALHÃES, J. T.; LARANGEIRA, D. F.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by \textit{{Leishmania} infantum} is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716304022>. Acesso em: 6 mar. 2024.

BRASIL, M. da S. B. S. de A. à S. D. de A. H. e de U. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.]

BRAZIL. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.]120 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantificatities utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemisty**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEDERS, S.; HUBER, I.; GROHMANN, L.; BERBEN, G.; TAVERNIERS, I.; MAZZARA, M.; ROOSENS, N.; MORISSET, D. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 115–126, 1 jun. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414000661>. Acesso em: 30 maio. 2025.

BROWN, M. Manson's tropical diseases. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 407, jul. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC7128861/>. Acesso em: 11 mar. 2024.

BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775–779, 15 jan. 1993. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.90.2.775>. Acesso em: 11 mar. 2024.

BUSTIN, S. A. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 96, p. 101249, 1 abr. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299724000086>. Acesso em: 30 maio. 2025.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>. Acesso em: 30 maio. 2025.

CAMPOS, A. M.; DOS SANTOS, C. L. C.; STUMPP, R.; DA SILVA, L. H. D.; MAIA, R. A.; PAGLIA, A. P.; ANDRADE FILHO, J. D. Photoperiod Differences in Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species Richness and Abundance in Caves in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 100–105, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/jme/tjw135>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CAÑAVATE, C.; HERRERO, M.; NIETO, J.; CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; APARICIO, P.; MULUGETA, A.; ARGAW, D.; BLACKSTOCK, A. J.; ALVAR, J.; BERN, C. Evaluation of two rK39 dipstick tests, direct agglutination test, and indirect fluorescent antibody test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a new epidemic site in highland Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 102–106, 1 jan. 2011. Disponível em: <http://intl.ajtmh.org/cgi/content/full/84/1/102>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CARNEIRO, L. A.; LIMA, L. V.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; RAMOS, P. K.; LAURENTI, M. D.; SILVEIRA, F. T. Prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis and its clinical–immunological features in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Veterinary Medicine and Science**, v. 9, n. 6, p. 2463–2474, 1 nov. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/vms3.1218>. Acesso em: 15 mar. 2024.

CAROLINE, C.; ÂNDRIA, C.; ALMEIDA, S.; BARRETO, M.; MELO, G.; DANTAS, A.; MÁRCIO, S.; SANTOS, B.; NUNES, R.; CAMPOS, S.; GUIMARÃES, A. G.; LIMA, P.; SANTOS, D.; CARLINI -POST, C. C.; GOMES, M. B.; PROGRAM, M.-P. G. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E FREQUÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO NORDESTE BRASILEIRO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **Revista Sergipana de Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 36–63, 22 dez. 2023. Disponível em: <https://revistasergipanadesaudepublica.org/index.php/rssp/article/view/58>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CARVALHO, M. R.; DIAS, Á. F. de L. R.; DE ALMEIDA, A. D. B. P. F.; ALVES, M. R.; PAES, A. S.; SOUSA, V. R. F. Canine visceral leishmaniasis: Perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of nossa senhora do livramento, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 1–11, 2020.

CASTELLI, G.; BRUNO, F.; REALE, S.; CATANZARO, S.; VALENZA, V.; VITALE, F. Diagnosis of leishmaniasis: Quantification of parasite load by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 865, 1 jul. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/865/htm>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CECCARELLI, M.; GALLUZZI, L.; MIGLIAZZO, A.; MAGNANI, M. Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88845, 13 fev. 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088845>. Acesso em: 30 maio. 2025.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M. da; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J. von; SÁ, B. Leishmaniose Visceral Americana: (Relatorio dos trabalhos realisados pela commissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 1, p. 89–229, 1938. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/HZN6w3wzmvVWbwj8GtXMbzR/?lang=pt>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CHICHARRO, C.; MORALES, M. A.; SERRA, T.; ARES, M.; SALAS, A.; ALVAR, J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. Supplement_1, p. S93–S99, 1 abr. 2002. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90058-1>. Acesso em: 11 mar. 2024.

CONTER, C. C.; MOTA, C. A.; DOS SANTOS, B. A.; DE SOUZA BRAGA, L.; DE SOUZA TERRON, M.; NAVASCONI, T. R.; FERNANDES, A. C. B. S.; DEMARCHI, I. G.; DE CASTRO, K. R. R.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. PCR primers designed for new world Leishmania: A systematic review. **Experimental Parasitology**, v. 207, p. 107773, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304138>. Acesso em: 30 maio. 2025.

COSTA, G. P.; SILVA, D. P. C.; ROCHA, D. de O. A. C.; TEIXEIRA, P. H. G. M{ÉTODOS} {DE} {DIAGNÓSTICO} {DA} {LEISHMANIOSE} {CANINA}. **Saber Científico (1982-792X)**, v. 9, n. 2, p. 95–104, 2021. Disponível em: <https://periodicos.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/1497>. Acesso em: 9 mar. 2024.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a {Cohort} of {Brazilian} {Dogs}: {Why} {Culling} {Fails} to {Control} {Visceral} {Leishmaniasis} in {Areas} of {High} {Transmission}. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/344312>. Acesso em: 6 mar. 2024.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, v. 326, n. 7385, p. 377–382, 15 fev. 2003. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/326/7385/377>. Acesso em: 11 mar. 2024.

DE ASSIS, T. S. M.; CALIGIORNE, R. B.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Detection of Leishmania kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 12, p. 1269–1272, 1 dez. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.013>. Acesso

em: 11 mar. 2024.

DE GODOY, N.; LIMA-JUNIOR, M.; LINDOSO, J.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.; OKAY, T.; BRAZ, L. A PCR and RFLP-based molecular diagnostic algorithm for visceral leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 13, n. 2, p. 62–70, 1 fev. 2020. Disponível em: <https://journals.lww.com/aptm/fulltext/2020/13020/a_pcr_and_rflp_based_molecular_diagnostic.3.aspx>. Acesso em: 11 mar. 2024.

DE JESUS, R. C. S.; LIMA, L. V. R.; CAMPOS, M. B.; RAMOS, P. K. S.; LAURENTI, D. M.; FERNANDO T. SILVEIRA, F. T. Reatividade de antígenos de amastigota e promastigota de Leishmania (L.) infantum chagasi no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina pela reação de imunofluorescência indireta e ELISA. 52° Congresso da Sociedade Brasileira de medicina Tropical. Centro de Convenções, Maceió-Alagoas, 2016.

DE RUITER, C. M.; VAN DER VEER, C.; LEEFLANG, M. M. G.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E. R. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147–3155, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24829226/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

DISCH, J.; MACIEL, F. C.; DE OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating Leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391–395, 1 jul. 2003.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. D. P.; FREITAS, R. A. De; MALACCO, M. A. F. Incrimination of \textit{{Lutzomyia} cruzi} as a vector of {American} {Visceral} {Leishmaniasis}. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315–317, 1998. Disponível em: <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2915.1998.00104.x>. Acesso em: 5 mar. 2024.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. FLUORESCENT ANTIBODY TEST FOR THE SERODIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS. **American Jnl. of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 5525–529, 1964. Disponível em: <https://apps.dtic.mil/sti/citations/tr/AD0451382>. Acesso em: 11 mar. 2024.

ERBER, A. C.; SANDLER, P. J.; DE AVELAR, D. M.; SWOBODA, I.; COTA, G.; WALOCHNIK, J. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification ({LAMP}) protocols: a systematic review and meta-analysis. **Parasites \& Vectors**, v. 15, n. 1, p. 34, 2022. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-05133-2>. Acesso em: 4 mar. 2024.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. De. Diagnóstico da {Leishmaniose} {Visceral} {Canina}: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 4 mar. 2024.

FARIAS, R. C. de; SANTOS, J. P. dos; NASCIMENTO, E. F. do; MENDES, J. R.; SOUSA, R. F. V. de; CARDOSO, D. R. F.; FONSECA, F. R. L. da; JUNIOR, E. C.; SILVA, K. M. R. da; MACHADO, J. L. C.; WERNECK, G. L.; GOMES, R. B. B. Estudo Comparativo Entre Metodologias Para O Diagnóstico Da Leishmaniose Visceral Humana: Uma Revisão Integrativa / Comparative Study Methodologies for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis: an Integrative Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 71398–71409, 2020.

FERNANDES, M. A.; AUGUSTO, J.; LEONEL, F.; ISAAC, J. A.; BENASSI, J. C.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; MARIA, T.; SOUSA, F. De. Molecular detection of Leishmania infantum DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. v. 2961, n. june, p. 194–202, 2019.
FERREIRA, G. R.; CASTELO BRANCO RIBEIRO, J. C.; MENESES FILHO, A.; DE JESUS CARDOSO FARIAS PEREIRA, T.; PARENTE, D. M.; PEREIRA, H. F.; DA SILVA, J.; ZACARIAS, D. A.; DA SILVA, L.; MEDEIROS FAUSTINO, S. K.; ALMEIDA NETO, W. S.; COSTA, D. L.; DE MENDONÇA, I.; NERY COSTA, C. H. Human {Competence} to {Transmit} {Leishmania} infantum to {Lutzomyia} longipalpis and the {Influence} of {Human} {Immunodeficiency} {Virus} {Infection}. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 126–133, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928688/>. Acesso em: 9 mar. 2024.

FILIPE DANTAS-TORRES; GUADALUPE MIRÓ; GAD BANETH; PATRICK BOURDEAU; EDWARD BREITSCHWERDT; GIOIA CAPELLI; LUÍS CARDOSO; MICHAEL J. DAY GERHARD DOBLER; LUIS FERRER; PETER IRWIN; FRANS JONGEJAN; VOLKHARD A.J. KEMPF; BARBARA KOHN; MICHAEL LAPPIN; SUSAN LITTLE; MAXIME MADDER; RICARDO MAGGI; CARLA MAIA; MARY MARCONDES, T.; ORSTEN NAUCKE; GAETANO OLIVA; MARIA GRAZIA PENNISI; BAREND L PENZHORN; ANDREW PEREGRINE; MARTIN PFEFFER; XAVIER ROURA; ANGEL SAINZ; SUNGSHIK SHIN; LAIA SOLANO-GALLEGO; REINHARD K. STRAUBINGER; SÉVERINE TASKER; REBECCA TRAUB; IAN WRIGHT; DWIGHT D. BOWMAN; LUIGI GRADONI; DOMENICO OTRANTO. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. No 12, p. 5–8, 2019.

FISSORE, C.; DELAUNAY, P.; FERRUA, B.; ROSENTHAL, E.; DEL GIUDICE, P.; AUFEUVRE, J. P.; LE FICHOUX, Y.; MARTY, P. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5332–5333, nov. 2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.42.11.5332-5333.2004>. Acesso em: 11 mar. 2024.

FONSECA JÚNIOR, J. D. da; MAZZINGHY, C. L.; FRANÇA, E. C.; PINOW, A. C. S.; ALMEIDA, K. de S. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 3, p. 1–8, 2021.
FORATTINI, O. P. Entomologia médica: 4º volume: psychodidae. phlebotominae. leishmanioses. bartonelose. *In*: **Entomologia médica: 4º volume: psychodidae. phlebotominae. leishmanioses. bartonelose**. [s.l: s.n.]p. 658.

FRAGA, T. L.; BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, J.; DE OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 310–313, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/XSkVhjBYTgLQGK46wPdJXLh/>. Acesso em: 30 maio.

2025.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, 30 abr. 2006.

FREIRE, M. L.; MACHADO DE ASSIS, T.; OLIVEIRA, E.; DE AVELAR, D. M.; SIQUEIRA, I. C.; BARRAL, A.; RABELLO, A.; UCIA COTA, G.; OSWALDO CRUZ, F.; HORIZONTE, B.; GERAIS, M.; MUNIZ, G. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007484, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007484>. Acesso em: 11 mar. 2024.

FURTADO, R. R.; ALVES, A. C.; LIMA, L. V. R.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; CAMPOS, M. B.; RAMOS, P. K. S.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; DA MATTA, V. L.; CORBETT, C. E.; SILVEIRA, F. T. Visceral Leishmaniasis Urbanization in the Brazilian Amazon Is Supported by Significantly Higher Infection Transmission Rates Than in Rural Area. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2188, 2022.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificaçao de phlebotominae. **Flebotomíneos do Brasil**, 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001549238>. Acesso em: 5 mar. 2024.

GALLETTI, E.; BONILAURI, P.; BARDASI, L.; CRISTINA, M.; RAMINI, M.; RENZI, M.; DOSA, G.; MERIALDI, G. Research in Veterinary Science 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.004>.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors 2018 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2 maio 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13071-018-2859-8>. Acesso em: 11 mar. 2024.

GARDNER, S. N.; THISSEN, J. B.; MCLOUGHLIN, K. S.; SLEZAK, T.; JAING, C. J. Optimizing SNP microarray probe design for high accuracy microbial genotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 3, p. 303–310, 1 set. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213002236>. Acesso em: 30 maio. 2025.

GOMES, A. B. S.; SÁ, F. J. N. de; BERNARDO, J. M. F.; LOBO, C. D. P. ABORDAGEM DIAGNÓSTICA LABORATORIAL NA LEISHMANIOSE. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 33, 1 mar. 2021. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rems/article/view/751>. Acesso em: 11 mar. 2024.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; BENTO, E. C.; REZENDE-OLIVEIRA, K.; NASCENTES, G. a. N.; BARBOSA, C. G.; BATISTA, L. R.; TIBURCIO, M. G. S.; PEDROSA, A. L.; LAGES-

SILVA, E.; RAMÍREZ, J. D.; RAMIREZ, L. E. Leishmania infection in bats from a non-endemic region of {Leishmaniasis} in {Brazil}. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1980–1986, 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/leishmania-infection-in-bats-from-a-nonendemic-region-of-leishmaniasis-in-brazil/BD67E7DF38B051C44457A93BA9FA8596>. Acesso em: 6 mar. 2024.

GONÇALVES, L. P; CASTRO, A. DE OLIVEIRA; TRINDADE, E.C; QUEIROZ, L. DO R.L; SILVEIRA, F. T; RAMOS, P. K. S. Diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em cães de área endêmica no Estado do Pará. **Anais do VIII Congresso de Educação em Saúde da Amazônia (COESA)**, Universidade Deferal do Pará - 09 a 12 de dezembro de 2019. ISSN 2359-084-X. 2019.

HARITH, A. E.; KOLK, A. H. J.; KAGER, P. A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F. J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J. J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 603–606, 1 jul. 1987.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; SEAN WALSH, P.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, v. 10, n. 4, p. 413–417, 1992. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt0492-413>. Acesso em: 30 maio. 2025.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A.; VOLLER, A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 5, p. 943–946, 1 set. 1983. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/6353959>. Acesso em: 11 mar. 2024.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′ → 3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1871133/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

HOMMEL, M. {THE} {GENUS} {LEISHMANIA}: {BIOLOGY} {OF} {THE} {PARASITES} {AND} {CLINICAL} {ASPECTS}. **THE GENUS LEISHMANIA: BIOLOGY OF THE PARASITES AND CLINICAL ASPECTS.**, 1978.

HOSPINAL-SANTIANI, M.; SOCCOL, C. R.; KARP, S. G.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; SANTOS, G. D. dos; SOCCOL, V. T. Real-Time PCR Assay for detection and quantification of Leishmania: standardization, positive control, validation, and intra-laboratory assay. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 7, n. 1, p. e2022006, 2023.

KATAKURA, K.; KAWAZU, S. I.; SANJYOBA, C.; NAYA, T.; MATSUMOTO, Y.; ITO, M.; NAGAKURA, K.; AIKAWA, M.; HASHIGUCHI, Y. Leishmania mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 6, p. 393–399, 1 dez. 1998. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/10622637>. Acesso em: 11 mar. 2024.

KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. **Methods in Molecular Biology**, v. 537, p. 39–64, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/24309046_Multiple_alignment_of_DNA_sequences_with_MAFFT>. Acesso em: 30 maio. 2025.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2608>. Acesso em: 5 mar. 2024.

KHAN, K. A.; CHEUNG, P. Evaluation of the Sequence Variability within the PCR Primer/Probe Target Regions of the SARS-CoV-2 Genome. **Bio-protocol**, v. 10, n. 24, p. e3871, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7842606/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, n. SUPPL. 1, p. 37–42, 1990. Disponível em: <https://www.parasite-journal.org/articles/parasite/abs/1990/06/parasite199065s1p37/parasite199065s1p37.html>. Acesso em: 11 mar. 2024.

KOCHER, A.; VALIÈRE, S.; BAÑULS, A. L.; MURIENNE, J. High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of Leishmania minicircles and identification of Neotropical species. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 585–594, 1 abr. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29144208/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 1 abr. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299705000907>. Acesso em: 30 maio. 2025.

KUMAR, A.; PANDEY, S. C.; SAMANT, M. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 10, p. e12727, 1 out. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pim.12727>. Acesso em: 11 mar. 2024.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species : a brief historical review of their discovery , ecology and taxonomy. v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis - distribution of the vector {Lutzomyia} longipalpis ({Lutz} \& {Neiva}) in relation to the fox cerdocyon thous ({Linn}) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 135–137, 1990. Disponível em: <https://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/4651573/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/7qNzZ67fX9gksRZLYry6wnH/?lang=en>. Acesso em: 11 mar. 2025.

LAINSON, R.; SHAW', J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (Leishmania) chagusi. **International Journal of Space Structures**, v. 2, n. 2, p. 123–125, 1987.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of Leishmania chagasi, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly Lutzomyia longipalpis. **Nature 1977 266:5603**, v. 266, n. 5603, p. 628–630, 1977. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/266628a0>. Acesso em: 11 mar. 2024.

LAISON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; PÓVOA, M. M.; ISHIHAWA, E. A. Y. A leishmania e as leishmanioses. *In*: **Instituto {Evandro} {Chagas}: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. [s.l: s.n.]p. 83–124.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R. da; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit \textit{{Leishmania}} (\textit{{Leishmania}}) \textit{infantum chagasi} to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3, p. 296–300, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713001623>. Acesso em: 4 mar. 2024.

LEE, L. G.; CONNELL, C. R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorgenic probes. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 16, p. 3761–3766, 11 ago. 1993. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/21.16.3761>. Acesso em: 30 maio. 2025.

LEMOS, M. D. A.; SOUSA, O. H. de; SILVA, Z. do S. S. B. da. {PERFIL} {DA} {LEISHMANIOSE} {VISCERAL} {NO} {BRASIL}: {UMA} {REVISÃO} {BIBLIOGRAFICA}. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 9, 2019. Disponível em: <https://jnt1.websiteseguro.com/index.php/JNT/article/view/399>. Acesso em: 6 mar. 2024.

LEÓN, C. M.; MUÑOZ, M.; HERNÁNDEZ, C.; AYALA, M. S.; FLÓREZ, C.; TEHERÁN, A.; CUBIDES, J. R.; RAMÍREZ, J. D. Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six Leishmania species DNA in Colombia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 301760, 4 out. 2017. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 30 maio. 2025.

LIMA, L. V. D. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; RAMOS, P. K.; LAURENTI, M. D.; TEIXEIRA, C. E. C.; SILVEIRA, F. T. Further evidence associating {IgG1}, but not {IgG2}, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by \textit{{Leishmania} ({L}.) infantum chagasi} -infection. **Parasite**, v. 24, p. 37, 2017. Disponível em: <http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2017039>. Acesso em: 4 mar. 2024.

LIMA, L. V. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DUE TO Leishmania (L .) infantum chagasi IN AMAZONIAN BRAZIL : COMPARISON OF THE PARASITE DENSITY FROM THE SKIN , LYMPH NODE AND VISCERAL TISSUES BETWEEN SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC , SEROPOSITIVE DOGS. v. 52, n. 5, p. 259–265, 2010.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J. A.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **Genome Research**, v. 4, n. 6, p. 357–362, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7580930/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das especies do genero Phlebotomus existentes no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84–95, 1912. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/zJmRfQPrKFyG9Z6DvnnQcyr/>. Acesso em: 11 mar. 2024.

LUZ, Z. M. P. da; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L. L. V.; FIÚZA, V. O. P.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da {Região} {Metropolitana} de {Belo} {Horizonte}. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 249–254, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/4rnMp6CQhy3htZcnTVLLKHp/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 5 mar. 2024.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; SALAH, A. Ben; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. COMPARATIVE EVALUATION OF ELISAS BASED ON TEN RECOMBINANT OR PURIFIED LEISHMANIA ANTIGENS FOR THE SERODIAGNOSIS OF MEDITERRANEAN VISCERAL LEISHMANIASIS. 2003.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1484, jan. 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001484>. Acesso em: 11 mar. 2024.

MAITY, A.; CHAKRABORTY, K. PCR Technology and Its Importance In Covid-19 Pandemic. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 10, n. 6, p. 95–103, 14 dez. 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/366859419_PCR_Technology_and_Its_Importance_In_Covid-19_Pandemic>. Acesso em: 30 maio. 2025.

MANDAL, J.; KHURANA, S.; DUBEY, M. L.; BHATIA, P.; VARMA, N.; MALLA, N. Short Report: Evaluation of Direct Agglutination Test, rk39 Test, and ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. 2008.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.

MARCELINO, A. P.; FILHO, J. A. de S.; E BASTOS, C. de V.; RIBEIRO, S. R.; MEDEIROS, F. A. C.; REIS, I. A.; LIMA, A. C. V. M. da R.; BARBOSA, J. R.; PAZ, G. F.; GONTIJO, C. M. F. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of Leishmania infantum in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, v. 207, p. 105495, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X19314779>. Acesso em: 30 maio. 2025.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, nov. 2004. Disponível em: </doi/pdf/10.1128/jcm.42.11.5249-5255.2004?download=true>. Acesso em: 30 maio. 2025.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237–246, 1999. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/genomic-diversity-in-the-leishmania-donovani-complex/B56F440BB5AD8156CA01A6E4C70DFDA3>. Acesso em: 11 mar. 2024.

MAURYA, R.; SINGH, R. K.; KUMAR, B.; SALOTRA, P.; RAI, M.; SUNDAR, S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3038–3041, jul. 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.43.7.3038-3041.2005>. Acesso em: 11 mar. 2024.

MENDONÇA, I. L. de; BATISTA, J. F.; LOPES, K. S. P. do P.; MAGALHÃES NETO, F. das C. R.; ALCÂNTARA, D. S.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; COSTA, C. H. N. Infection of \textit{{Lutzomyia} longipalpis} in cats infected with \textit{{Leishmania} infantum}. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109058, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401720300388>. Acesso em: 6 mar. 2024.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, nov. 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.43.11.5515-5519.2005>. Acesso em: 11 mar. 2024.

MOLINA DE OLIVEIRA, D.; VALDRINEZ, M.; LONARDONI, C.; TEODORO, U.; GOMES, T.; SILVEIRA, V. Comparison of different primes for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 204–210, jun. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/q6pxkCMwfv3PpcZfBmkjwQS/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine {Leishmaniasis}: {Update} on {Epidemiology}, {Diagnosis}, {Treatment}, and {Prevention}. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9416075/>. Acesso em: 4 mar. 2024.

MOTTA, L.; EBERT, K.; BATISTA, K. Diagnóstico imunológico e molecular da {Leishmaniose} {Visceral} {Canina}: {Revisão}. **Pubvet**, v. 15, p. 1–7, 2021.

NASSIRI, M.; ELAHI TORSHIZI, M.; GHOVVATI, S.; DOOSTI, M. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. **Journal of Applied Statistics**, v. 45, n. 2, p. 306–319, 25 jan. 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/312350842_Evaluation_of_different_statistical_methods_using_SAS_software_an_in_silico_approach_for_analysis_of_real-time_PCR_data>. Acesso em: 30 maio. 2025.

NETO, C. D. M. B. G. Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial Didelphis albiventris Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do Pojuca, Bahia. p. 76–76, 2006.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of Leishmania in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1666–1669, 2002. Disponível em: </doi/pdf/10.1128/jcm.40.5.1666-1669.2002?download=true>. Acesso em: 30 maio. 2025.

NOVY, F. G. SUCCESSFUL CANINE INFECTION WITH CULTURES OF LEISHMANIA INFANTUM (C. NICOLLE). **Journal of the American Medical Association**, v. LI, n. 17, p. 1423–1424, 24 out. 1908. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/428335>. Acesso em: 11 mar. 2024.

OSMAN, O. F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E. E.; KROON, N. C. M.; SCHOONE, G. J.; KHALIL, E. T. A. G.; EL-HASSAN, A. M.; KAGER, P. A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2454–2457, 1997. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.35.10.2454-2457.1997>. Acesso em: 11 mar. 2024.

PAHO, P. \textbar P. A. H. O. Leishmaniases: {Epidemiological} {Report} on the {Region} of the {Americas} - {PAHO} {\textbar} {Pan}-{American} {Heath} {Organization}. p. 1–14, 2023. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.

PAHO, P. \textbar P. A. H. O. **Unprecedented progress against neglected tropical diseases reported - {PAHO} {\textbar} {Pan} {American} {Health} {Organization}**2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/news/19-4-2017-unprecedented-progress-against-neglected-tropical-diseases-reported>. Acesso em: 4 mar. 2024.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/v7JwYRNmt5ggcK5jzfyK4hP/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

PARKER, L. A.; ACOSTA, L.; GUTIERREZ, M. N.; CRUZ, I.; NIETO, J.; DESCHUTTER, E. J.; BORNAY-LLINARES, F. J. A Novel Sampling Model to Study the Epidemiology of Canine Leishmaniasis in an Urban Environment. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. March, p. 1–9, 2021.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral : aspectos clínicos e laboratoriais, Visceral leishmaniasis : clinical and

laboratorial aspects. v. 78, p. 120–127, 2002.

PEREIRA, E. A.; CHAGAS, E. J.; LIMA, L. V. R.; et al. A eliminação regular de cães soropositivos para Leishmaniose visceral reduz a transmissão da enzootia canina em área endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 115, 2006.

PERIS, M. P.; ESTEBAN-GIL, A.; ORTEGA-HERNÁNDEZ, P.; MORALES, M.; HALAIHEL, N.; CASTILLO, J. A. Comparative Study of Real-Time PCR (TaqMan Probe and Sybr Green), Serological Techniques (ELISA, IFA and DAT) and Clinical Signs Evaluation, for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 2627**, v. 9, n. 12, p. 2627, 20 dez. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/12/2627/htm>. Acesso em: 30 maio. 2025.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. E45, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

PIMENTA, P. F. P.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 359–369, 1997. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/novel-role-for-the-peritrophic-matrix-in-protecting-leishmania-from-the-hydrolytic-activities-of-the-sand-fly-midgut/4FA9155A2FCCE79DF2400CCDEBD56909>. Acesso em: 11 mar. 2024.

POMARI, E.; PIUBELLI, C.; PERANDIN, F.; BISOFFI, Z. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 12, p. 1510–1516, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226445/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, maio 2007. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CVI.00420-06>. Acesso em: 11 mar. 2024.

PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Real time PCR. application in dengue studies. **Colombia Medica**, v. 42, n. 2, p. 243–258, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/236869490_Real_time_PCR_Application_in_dengue_studies>. Acesso em: 30 maio. 2025.

PROMEGA CORPORATION. ReliaPrep(TM) gDNA Tissue Miniprep System Technical - Manual for A2050, A2051 and A2052. p. 1–7, 2013. Disponível em: <www.promega.com>. Acesso em: 13 mar. 2024.

RAMOS, P. K. S.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, E. O.; QUARESMA, J. A. S.; SARAIVA, E. M.; SEABRA, S. H.; ATELLA, G. C.; DE SOUZA, W. Characterization in vivo and in vitro of a strain of Leishmania (Viannia) shawi from the Amazon Region. **Parasitology International**, v. 58, n. 2, p. 154–160, 1 jun. 2009.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do {Brasil}. *In*: **Flebotomíneos do {Brasil}**. [s.l: s.n.]p. 368.

RATZLAFF, F. R.; OSMARI, V.; DA SILVA, D.; DE PAULA VASCONCELLOS, J. S.; PÖTTER, L.; FERNANDES, F. D.; DE MELLO FILHO, J. A.; DE AVILA BOTTON, S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. Identification of infection by {Leishmania} spp. in wild and domestic animals in {Brazil}: a systematic review with meta-analysis (2001–2021). **Parasitology Research**, v. 122, n. 7, p. 1605–1619, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07862-y>. Acesso em: 6 mar. 2024.

RÊGO, F. D.; SOARES, R. P. \textit{{Lutzomyia} longipalpis}: an update on this sand fly vector. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20200254, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/NbnKTGb4D9HrH64PHbfsQsN/>. Acesso em: 5 mar. 2024.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; HAYASAKA, E. Y.; VICTORIA, C.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection ofLeishmaniaspp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 01–07, 5 ago. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/s5qMDPKPn5TpfH4tKXbnx8N/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

RIHS, J. B.; VILELA, M. T.; DOS SANTOS, J. S. C.; CALDAS, S.; LEITE, R. S.; MOL, M. P. G. Exploring real-time PCR techniques for diagnosing leishmaniasis: key insights from a systematic review. **Parasitology Research**, v. 124, n. 5, p. 1–12, 1 maio 2025a. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-025-08503-2>. Acesso em: 30 maio. 2025.

RIHS, J. B.; VILELA, M. T.; DOS SANTOS, J. S. C.; DE SOUZA FILHO, J. A.; CALDAS, S.; LEITE, R. S.; MOL, M. P. G. qPCR as a Tool for the Diagnosis of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Acta Parasitologica 2024 70:1**, v. 70, n. 1, p. 1–16, 7 jan. 2025b. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11686-024-00942-8>. Acesso em: 30 maio. 2025.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J.; ANDRADE, M. J. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 1275, p. 31–56, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2365-6_3>. Acesso em: 30 maio. 2025.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251, 1 dez. 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4241529/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261, 11 nov. 1903. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2514667/>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.;

ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 20 dez. 1985. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2999980>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SALOMON, O. D. Lutzomyia longipalpis, {Gone} with the {Wind} and {Other} {Variables}. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 161–171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00811-9>. Acesso em: 5 mar. 2024.

SALOMÓN, O. D.; ORELLANO, P. W. Lutzomyia longipalpis in {Clorinda}, {Formosa} province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in {Argentina}. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475–476, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/4Dx8xDzxmFgVBbyJhTvLjLD/>. Acesso em: 5 mar. 2024.

SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; POGUE, G. P.; LEE, N.; NAKHASI, H. L.; RAMESH, V.; NEGI, N. S. Development of a species-specific PCR assay for detection of Leishmania donovani in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 849–854, 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.39.3.849-854.2001>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SANTOS, J. B. dos. {ASPECTOS} {EPIDEMIOLOGICOS} {DA} {LEISHMANIOSE} {VISCERAL} {NO} {CONTEXTO} {DA} {SAÚDE} Ú{NICA}: {UMA} {REVISÃO}: {UMA} {REVISÃO}. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 16, n. 1, 2024. Disponível em: <http://revista.sear.com.br/rei/article/view/534>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SANTOS, M. O. D. F.; AMORIM, A. B. R.; BARBOSA, F. de Q.; FERREIRA, K. D.; FILHO, R. B. Leishmaniose visceral canina: princípios do diagnóstico / Canine visceral leishmaniasis: principles of diagnosis. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 92194–92200, 2021.

SAPATERA, N. de S. Visceral leishmaniasis in wild canids – literature review. 2022.
SAÚDE, S. de V. em S. | M. da. **Boletim Epidemiológico - Doenças tropicais negligenciadas**, 2021. . (Nota tecnica).

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine & International Health**, v. 7, n. 8, p. 641–651, 1 ago. 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3156.2002.00911.x>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name {Leishmania} ({Leishmania}) infantum chagasi for the aetiological agent of {American} visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577–579, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/RjcTB7P6LjnZWdSHwtSLNDn/?lang=en>. Acesso em: 5 mar. 2024.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of {Bahia}, {Brazil}. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671–683, 1996. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/gSNt3GLXSvJZzBCJ5tYfr7N/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SILVA, A. S. da; SILVA, M. V. S. da; REIS, D. S. T. dos; COUTO, D. C. C.; PINTO, D. da

S.; MELO, L. S. C. de; COSTA, D. C. dos S.; FARIAS, T. C. B.; MAROJA, M. C. F. de S.; BARROS, S. H. P. de. Perfil epidemiológico e distribuição espacial da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 6, p. e10242, 2022.

SILVA, R. R. da; SILVA, A. de S.; CAMPOS, R. N. de S. {LEISHMANIOSE} {VISCERAL} {EM} {CÃES} {NO} {BRASIL}: {REVISÃO} {DE} {LITERATURA}. **Science and Animal Health**, v. 9, n. 1, p. 54–75, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/veterinaria/article/view/21441>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SILVA, F. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 31, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/220000420>. Acesso em: 15 mar. 2024.

SILVA, R. A.; SANTOS, F. K. M.; SOUSA, L. C. de; RANGEL, E. F.; BEVILAQUA, C. M. L. Ecology of \textit{{Lutzomyia} longipalpis} and \textit{{Lutzomyia} migonei} in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 320–327, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/XDGj5GsKVrTYMJrBDZN5b5d/>. Acesso em: 5 mar. 2024.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUZA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the semi-arid region of Paraiba and analysis of diagnostic techniques. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625–629, 1 jul. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/jgKmMn6T5YfKDLXswwvpRJg/abstract/?lang=en>. Acesso em: 30 maio. 2025.

SILVEIRA, F. T.; CARNEIRO, L. A; RAMOS, P. K.; et al. Cross-sectional study on canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, v. 11, p. 1513–1522, 2012.

SILVEIRA, F. T.; COSTA, E.; JUNIOR, S.; VELLASCO, R.; SILVESTRE, D.; CAMPOS, M. B.; LUCIA, V.; GOMES, C. M.; FLORES, G. V. A.; PACHECO, C. M. S.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, D. Comparative Genomic Analyses of New and Old World Viscerotropic Leishmanine Parasites : Further Insights into the Origins of Visceral Leishmaniasis Agents. 2023.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE SOUZA, A. A. A.; CAMPOS, M. B.; CARNEIRO, L. A.; LIMA, L. V. R.; RAMOS, P. K. S.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human {Leishmania} ({L}.) infantum chagasi infection in {Amazonian} {Brazil}. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 377–386, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1672-x>. Acesso em: 9 mar. 2024.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. M. Leishmaniasis in {Brazil}: {XVIII}. {Further} evidence incriminating the fox {Cerdocyon} thous ({L}) as a reservoir of {Amazonian} visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 830–832, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90119-5>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SILVEIRA F. T, LAINSON R, de SOUZA A. A. A, CRESCENTE J. A. B, CORBETT C. E. P. Leishmaniose visceral americana. In: Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia, 1ed., Leão R, Ed. Samauma, Belém, PA, Brasil, vol 2, 1245-1274, 2013

SILVEIRA, F. T.; LIMA, L. V. do R.; SANTOS, T. V. dos; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. esp, p. 15–22, 2016.

SILVEIRA, F. T.; SOUSA JUNIOR, E. C.; SILVESTRE, R. V.; COSTA-MARTINS, A. G.; DA COSTA PINHEIRO, K.; SOSA OCHOA, W.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; RAMOS, P. K.; CASSEB, S.; DA SILVA, S. P.; VALERIANO, C. Z.; LIMA, L. V.; CAMPOS, M. B.; DA MATTA, V. L.; GOMES, C. M.; FLORES, G. V.; PACHECO, C. M.; CORBETT, C. E.; NAKAYA, H.; LAURENTI, M. D. Whole-Genome Sequencing of Leishmania infantum chagasi Isolates from Honduras and Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 48, 2 dez. 2021a. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.00471-21>. Acesso em: 15 mar. 2024.

SILVEIRA, N. S. D.; MENDES, E. M.; PEREIRA, M. L.; TAVELA, A. D. O.; VEIGA, A. P. M.; ZIMERMANN, F. C. Visceral leishmaniasis in dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n. December 2020, p. 1–12, 2021b.

SINAN SVS, M. S. S. de I. de A. de N. **{LEISHMANIOSE} {VISCERAL} - {Casos} confirmados por {Região} de notificação segundo {Ano} {Notificação} - {Brasil}**2022. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 4 mar. 2024.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SUN, Y.; NAKAMURA, T.; OHTSU, Y.; KAKEHI, M.; DANNO, N.; SHIMIZU, H.; TANAKA, Y.; SERELLI-LEE, V.; TANAKA, S.; OKAYAMA, T.; SUDA, Y.; MORIYA, Y.; HANADA, T.; SAITO, Y. Development and validation of qPCR methods for nucleic acid biomarkers as a drug development tool: Points to consider. **Bioanalysis**, v. 15, n. 17, p. 1069–1081, 2023.

SUNDAR, S.; OM, ·; SINGH, P.; SINGH, O. P.; SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy 2018 22:4**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 19 jun. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40291-018-0343-y>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, set. 2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>. Acesso em: 11 mar. 2024.

TAYLOR, S. C.; NADEAU, K.; ABBASI, M.; LACHANCE, C.; NGUYEN, M.; FENRICH, J. The Ultimate qPCR Experiment : Producing Publication Quality , Reproducible Data the First Time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1–S5, 1 abr. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202310000204>. Acesso em: 30 maio. 2025.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.

TRIGO, B. B. **DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE SUBGÊNERO, COMPLEXO E ESPÉCIES DE Leishmania Beatriz**. 2018. 2018.

URIAS, E. V. R.; CARVALHO, S. F. G.; OLIVEIRA, C. L.; CARVALHO, M. de L. M.; TELES, L. F.; RODRIGUES, M. C.; MAIA, C. N. Prevalência de adultos infectados por {Leishmania} leishmania chagasi entre doadores de sangue do {Hemocentro} {Regional} de {Montes} {Claros}, {Minas} {Gerais}, {Brasil}. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 348–354, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/YXLQ8vLcctgN8LkNKwKC4Nq/>. Acesso em: 5 mar. 2024.

VAISH, M.; BHATIA, A.; REED, S. G.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, p. 81–85, 1 jan. 2012.

VALE, A. M.; FUJIWARA, R. T.; DA SILVA NETO, A. F.; MIRET, J. A.; ALVAREZ, D. C. C.; DA SILVA, J. C. F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of leishmania species by antibodies from leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 1, p. 41–48, fev. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18990196/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 1 mar. 2019. Disponível em: <http://www.id.theclinics.com/article/S0891552018300928/fulltext>. Acesso em: 11 mar. 2024.

VIANA, L. de G.; MACHADO DE ASSIS, T. S.; ORSINI, M.; DA SILVA, A. R.; DE SOUZA, G. F.; CALIGIORNE, R.; DA SILVA, A. C. L.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARCIANO, A. P. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; RABELLO, A. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic Leishmania (Leishmania) chagasi carriers who present modulated cytokine profiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 6, p. 548–555, 1 jun. 2008. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.007>. Acesso em: 11 mar. 2024.

VIEIRA, L.; LIMA, R.; ALMEIDA CARNEIRO, L.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS, T.; SANTOS, D.; RAMOS, P. K.; DALASTRA LAURENTI, M.; TEIXEIRA, C. E. C.; SILVEIRA, F. T. Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine

visceral leishmaniasis caused by Leishmania (L.) infantum chagasi-infection. **Parasite**, v. 24, p. 37, 2017. Disponível em: <www.parasite-journal.org>. Acesso em: 23 abr. 2024.

VIEIRA, V. P. da C.; FIGUEIREDO, N. M. {LEISHMANIOSE} {VISCERAL} {CANINA}: {BREVE} {REVISÃO} {E} {RELATOS} {DE} {CASOS}. **Veterinária e Zootecnia**, v. 28, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/577>. Acesso em: 4 mar. 2024.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E., BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull World Health Organ.** v. 53, n. 1, p. 55-65, 1976.

WALTERS, L. L. Leishmania {Differentiation} in {Natural} and {Unnatural} {Sand} {Fly} {Hosts1}. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196–206, 1993. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04904.x>. Acesso em: 5 mar. 2024.

WEIRATHER, J. L.; JERONIMO, S. M. B.; GAUTAM, S.; SUNDAR, S.; KANG, M.; KURTZ, M. A.; HAQUE, R.; SCHRIEFER, A.; TALHARI, S.; CARVALHO, E. M.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of Leishmania spp. in Human Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892, nov. 2011. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3209110/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of {Leishmania}: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x>. Acesso em: 5 mar. 2024.

WHO, W. H. O. Control of the leishmaniases. **WHO Technical Report Series**, v. 949, p. 22–26, 2010.

WHO, W. H. O. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2022 - {WHO} {\textbar} {World} {Health} {Organization}**2022. Disponível em: <https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2022.png?sfvrsn=57d2c12f_3>. Acesso em: 4 mar. 2024.

WHO, W. H. O. **Neglected tropical diseases - {WHO} {\textbar} {World} {Health} {Organization}Neglected tropical diseases**2024a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 4 mar. 2024.

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis - Newsroom**2024b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 4 mar. 2024.

WU, Z.; BAO, Y.; DING, Y.; YU, M.; LU, L.; ZHANG, Y. An experimental study on application of PCR in detection of kala-azar. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 28, n. 1, p. 169–172, 1 mar. 1997. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/9322302>. Acesso em: 11 mar. 2024.

ZELEDÓN, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. [Ecology of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica].

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 79, n. 4, p. 455–459, 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6533420/>. Acesso em: 11 mar. 2024.

ZHANG, W.; HUANG, H.; WANG, L.; LEHMANN, B. D.; CHEN, S. X.; MACDONALD, J. T. An Integrative Multi-Omics Random Forest Framework for Robust Biomarker Discovery. **bioRxiv**, p. 2025.03.05.641533, 6 mar. 2025. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.03.05.641533v2>. Acesso em: 13 mar. 2025.

ZHANG, Y.; LI, H.; SHANG, S.; MENG, S.; LIN, T.; ZHANG, Y.; LIU, H. Evaluation validation of a qPCR curve analysis method and conventional approaches. **BMC Genomics**, v. 22, n. Suppl 5, p. 680, 1 nov. 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8596907/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

ZINCHUK, A.; NADRAGA, A. Congenital visceral leishmaniasis in {Ukraine}: case report. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 30, n. 2, p. 161–164, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/146532810X12703902516400>. Acesso em: 5 mar. 2024.

ANEXO A

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Parecer de Aprovação Nº 0025/2011/CEPAN/IEC/SVS/MS

Protocolo CEPAN - nº 026/2011

Ananindeua/PA, 03 de novembro de 2011.

Projeto: **"Prevalência da infecção canina causada por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* determinada pela PCR em amostras do aspirado de linfonodo".**

Pesquisador Responsável: Patrícia Karla Santos Ramos

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado.**

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO: MARCO – CEP: 66090-000 – BELÉM-PA – C.N.P.J.: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 246-6422 – FAX: (091)664669RODOVIA BR 316 – KM 07, SNº - BAIRRO: - LEVILÂNDIA – CEP: 67.030-000 – ANANINDEUA-PA – FONE: (091) 214-2000
http://www.iec.pa.gov.br

ANEXO B

CEUA

Instituto Evandro Chagas
MS- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
1936-2016

CERTIFICADO nº 43/2015

Certificamos que o projeto intitulado **"Avaliação das alterações ambientais e sociais e sua influência no quadro nosológico nas áreas de ifluência das Minas de Ferro do Complexo Carajás Norte, Projeto Ferro Carajás S11D, Projeto Serra Leste, Mina do Manganês do Azul e do Salobo",** protocolo nº **06/2014**, sob a responsabilidade de **Lívia Carício Martins**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – que através da carta datada de 10 de dezembro de 2015, solicita a prorrogação do mesmo para mais dez anos. Informamos que após análise das justificativas, a referida solicitação encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Obs.: O Certificado nº 10/2014 de 14/05/2014, perde sua validade a partir desta data.

Vigência do Projeto	Até dezembro de 2025
Espécie/Linhagem	Ave 300, Camundongo heterogênico 4.200, Hamster (M. auratus) 100, Roedores 80, Marsupiais 20, Edentados 04, Quirópteros10, Carnívoros 10.
Nº de animais	4.724
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Biotério, fazenda, aviário, etc.

De acordo com Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 21 de dezembro de 2015.

Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
Secretária da CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS

Thiago Vasconccelos dos Santos
Vice Coordenador da CEUA

ANEXO C

Numeração	Localidade	Data de Coleta	Tipo de Animal
1	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
2	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
3	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
4	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
5	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
6	Barcarena	15/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
7	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
8	Barcarena	15/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
9	Barcarena	35/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
10	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
11	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
12	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
13	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
14	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
15	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
16	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
17	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
18	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
19	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
20	Barcarena	12/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
21	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
22	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
23	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
24	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
25	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
26	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
27	Barcarena	14/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
28	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
29	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
30	Barcarena	13/10/2010	Cão (*Canis familiaris*)
31	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
32	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
33	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
34	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
35	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
36	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
37	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
38	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
39	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
40	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
41	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
42	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
43	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
44	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
45	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
46	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)

47	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
48	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
49	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
50	Tapanã*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
51	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
52	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
53	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
54	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
55	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
56	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
57	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
58	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
59	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
60	Icoaraci*	2017	Cão (*Canis familiaris*)
61	Terra Alta	08/2010	Raposa
62	Marabá	28/03/2019	Raposa
63	Canaã dos Carajás	02/07/2012	Raposa
64	Terra Alta	24/08/2010	Raposa
65	Canaã dos Carajás	26/06/2012	Raposa
66	Canaã dos Carajás	26/06/2012	Raposa
67	Canaã dos Carajás	26/06/2012	Raposa
68	Canaã dos Carajás	27/06/2012	Raposa
69	Canaã dos Carajás	09/04/2019	Raposa
70	Canaã dos Carajás	09/04/2019	Raposa
71	Curianópolis**	28/03/2014	Raposa
72	Curianópolis**	28/03/2014	Raposa
73	Curianópolis**	24/03/2023	Marsupial
74	Curianópolis**	24/03/2023	Marsupial
75	Curianópolis**	28/03/2023	Marsupial
76	Curianópolis**	30/03/2023	Roedor
77	Curianópolis**	30/03/2023	Roedor
78	Curianópolis**	07/04/2023	Raposa
79	Curianópolis**	18/11/2022	Raposa
80	Curianópolis**	19/11/2022	Roedor
81	Curianópolis**	22/11/2022	Roedor
82	Canaã dos Carajás	15/11/2018	Raposa
83	Canaã dos Carajás	15/11/2018	Raposa
84	Parauapebas	19/11/2013	Raposa
85	Curianópolis**	03/04/2024	Raposa

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.
*Região Metropolitana de Belém
**Serra Leste

ANEXO D

Numeração	Localidade	Animal	Resultado (ELISA – indireto IgG)	Resultado qPCR (qualitativo)	Resultado qPCR (Média do Cq -ΔRn)***
1	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.76**
2	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.18**
3	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.44**
4	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.80**
5	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.94**
6	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**34.18**
7	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**29.36**
8	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.54**
9	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**29.61**
10	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**24.24**
11	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.14**
12	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.33**
13	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.82**
14	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.32**
15	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**26.04**
16	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.67**
17	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.98**
18	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.43**
19	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**22.95**
20	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**29.34**
21	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.46**
22	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.85**
23	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.27**
24	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.89**
25	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.40**
26	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.72**
27	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.23**
28	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.20**
29	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.36**
30	Barcarena	Cão	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.19**
31	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.35**
32	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**38.83**
33	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**38.68**
34	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.23**
35	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.17**
36	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.35**
37	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.78**
38	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**38.14**
39	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**38.41**
40	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.70**
41	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.73**
42	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.67**
43	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**39.57**
44	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.95**

45	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.76**
46	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.80**
47	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**35.84**
48	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.24**
49	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**36.86**
50	Tapanã*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.41**
51	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.82**
52	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**35.27**
53	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**31.40**
54	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.22**
55	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**38.23**
56	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.78**
57	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**35.86**
58	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.72**
59	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**37.61**
60	Icoaraci*	Cão	**NEGATIVO**	**NEGATIVO**	**Sem Cq**
61	Terra Alta	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**33.12**
62	Marabá	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**29.63**
63	Canaã dos Carajás	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.68**
64	Terra Alta	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**30.76**
65	Canaã dos Carajás	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**36.01**
66	Canaã dos Carajás	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**32.61**
67	Canaã dos Carajás	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**30.91**
68	Canaã dos Carajás	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.64**
69	Canaã dos Carajás	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**29.22**
70	Canaã dos Carajás	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**33.60**
71	Curianópolis**	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**33.03**
72	Curianópolis**	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**31.48**
73	Curianópolis**	Marsupial	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**33.91**
74	Curianópolis**	Marsupial	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**35.11**
75	Curianópolis**	Marsupial	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**32.97**
76	Curianópolis**	Roedor	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**31.81**
77	Curianópolis**	Roedor	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**31.51**
78	Curianópolis**	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**30.85**
79	Curianópolis**	Raposa	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**28.29**
80	Curianópolis**	Roedor	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**34.02**
81	Curianópolis**	Roedor	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**33.88**
82	Canaã dos Carajás	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**27.99**
83	Canaã dos Carajás	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**28.53**
84	Parauapebas	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**28.61**
85	Curianópolis**	Raposa	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**28.30**

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2025.

*Região metropolitana de Belém

**Serra Leste

*** Amostra Testada em duplicata