



JAQUELINE APARECIDA SOUSA PEREIRA

**ANALYSIS OF THE MOLECULAR DIAGNOSIS BY
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) OF
ASYMPTOMATIC CANINE INFECTION BY *Leishmania*
infantum.**

LAVRAS – MG

2025

JAQUELINE APARECIDA SOUSA PEREIRA

**ANALYSIS OF THE MOLECULAR DIAGNOSIS BY POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR) OF ASYMPTOMATIC CANINE INFECTION BY *Leishmania*
infantum.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Programa de
Pós Graduação em Ciências Veterinárias, área de
concentração Sanidade animal e saúde coletiva,
para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dra. Ana Paula Peconick. UFLA

Orientadora

Prof. Dr. Sidney de Almeida Ferreira. UFLA

Prof. Dr. Joseane Camilla de Castro. UFLA

Coorientadores

LAVRAS-MG

2025

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Jaqueline Aparecida Sousa.

Analysis of the molecular diagnosis by polymerase chain reaction (PCR) of asymptomatic canine infection by *Leishmania infantum*. / Jaqueline Aparecida Sousa Pereira. - 2026.

112 p.

Orientadora: Ana Paula Peconick

Coorientador: Sidney de Almeida Ferreira

Coorientadora: Joseane Camilla de Castro

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.

Bibliografia.

1. Diagnóstico molecular para Leishmaniose visceral canina assintomática. 2. zoonose. 3. Bioinformática. 4. Desenho de primers. 5. Revisão sistemática. I. Peconick, Ana Paula. II. Ferreira, Sidney de Almeida. III. de Castro, Joseane Camilla. IV. Universidade Federal de Lavras. V. Título.

JAQUELINE APARECIDA SOUSA PEREIRA

ANALYSIS OF THE MOLECULAR DIAGNOSIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) OF ASYMPTOMATIC CANINE INFECTION BY *Leishmania infantum*.

ANÁLISE DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE INFECÇÃO CANINA ASSINTOMÁTICA POR *Leishmania Infantum*.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade animal e saúde coletiva, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 26 de janeiro de 2026

Dra. Carine Rodrigues Pereira – UFLA

Dr. Sidney de Almeida Ferreira – UFLA

Dr. Fabricio Luciani Valente – UFV

Documento assinado digitalmente
 **ANA PAULA PECONICK**
Data: 27/02/2026 10:09:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Ana Paula Peconick. UFLA

Orientadora

Prof. Dr. Sidney de Almeida Ferreira. UFLA

Prof. Dr. Joseane Camilla de Castro. UFLA

Coorientadores

LAVRAS-MG

2025

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de elevada relevância em saúde pública, com ampla distribuição geográfica e impacto crescente em áreas urbanas e periurbanas. O cão doméstico desempenha papel central na manutenção do ciclo de transmissão da *L. infantum*, sobretudo em contextos endêmicos, nos quais infecções assintomáticas são frequentes e epidemiologicamente relevantes. Nesse cenário, o diagnóstico preciso desses animais representa um dos principais desafios para as estratégias de vigilância e controle da doença. Métodos sorológicos, amplamente utilizados em programas oficiais, apresentam limitações importantes relacionadas à sensibilidade em fases iniciais da infecção, à variabilidade da resposta imune e à ocorrência de reações cruzadas, especialmente em cães assintomáticos. Diante dessas limitações, técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido amplamente investigadas como ferramentas mais robustas para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. O presente trabalho teve como objetivo consolidar evidências sobre a real acurácia diagnóstica de métodos de PCR para identificação de cães assintomáticos com leishmaniose visceral por meio de revisão sistemática e metanálise, conforme diretrizes metodológicas estabelecidas. Especificamente, buscou-se: (1) estabelecer um referencial teórico abordando aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral, a importância do cão como reservatório, e as principais limitações dos métodos diagnósticos; (2) realizar metanálise a acurácia diagnóstica das técnicas de PCR em cães assintomáticos; e (3) desenvolver e validar *in silico* primers específicos para *L. infantum* direcionados aos genes HSP60, CPB e G3PD. Para a revisão sistemática e metanálise foram incluídos 13 estudos. A análise verificou que a qPCR apresentou especificidade de 65,6%, e sensibilidade de 90,1% enquanto a PCR convencional declarou especificidade de 92,5% com sensibilidade de 75,3%. A acurácia global foi de 77,3% (IC95%: 65,1-86,2) com heterogeneidade substancial. O tipo de amostra e os primers utilizados não influenciaram significativamente o desempenho. A análise de risco de viés revelou fragilidades metodológicas relevantes entre os estudos incluídos. Quanto ao desenho de primers, as sequências genômicas foram selecionadas no TriTrypDB. Análises termodinâmicas por OligoAnalyser, e avaliações de especificidade *in silico* por Primer-BLAST confirmaram alinhamentos preferenciais com *L. infantum* e múltiplos polimorfismos em espécies não-alvo, indicando baixa probabilidade de amplificação cruzada. Os resultados reforçam que as técnicas de PCR constituem ferramentas relevantes para o diagnóstico da infecção canina assintomática por *L. infantum*. Contudo, a incorporação dessas técnicas aos programas de controle depende da padronização metodológica, da validação em diferentes cenários epidemiológicos e da integração entre abordagens moleculares, sorológicas e analíticas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina; Acurácia; Sensibilidade, Especificidade; Reação em cadeia de polimerase.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease of high relevance to public health, with widespread geographical distribution and increasing impact in urban and periurban areas. The domestic dog plays a central role in maintaining the transmission cycle of *Leishmania infantum*, particularly in endemic contexts, where asymptomatic infections are frequent and epidemiologically relevant. In this scenario, accurate diagnosis of these animals represents one of the main challenges for disease surveillance and control strategies. Serological methods, widely used in official programs, present important limitations related to sensitivity in early phases of infection, variability of immune response, and the occurrence of cross-reactions, especially in asymptomatic dogs. Given these limitations, molecular techniques based on polymerase chain reaction (PCR) have been extensively investigated as more robust diagnostic tools for canine visceral leishmaniasis. The present work aimed to consolidate evidence on the true diagnostic accuracy of PCR methods for identifying asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis through a systematic review and meta-analysis, according to established methodological guidelines. Specifically, this study sought to: (1) establish a theoretical framework addressing epidemiological aspects of visceral leishmaniasis, the importance of dogs as reservoirs, and the main limitations of current diagnostic methods; (2) conduct a meta-analysis of the diagnostic accuracy of PCR techniques in asymptomatic dogs; and (3) design and validate *in silico* primers specific for *L. infantum* targeting the HSP60, CPB, and G3PD genes. For the systematic review and meta-analysis, 13 studies were included. The analysis showed that qPCR presented sensitivity of 90.1% and specificity of 65.6%, while conventional PCR demonstrated specificity of 92.5% with sensitivity of 75.3%. Overall diagnostic accuracy was 77.3% (95% CI: 65.1-86.2) with substantial heterogeneity. Sample type and primers used did not significantly influence performance. Risk of bias analysis revealed relevant methodological weaknesses among included studies. Regarding primer design, genomic sequences were selected from TriTrypDB. Thermodynamic analyses by OligoAnalyzer and *in silico* specificity assessments by Primer-BLAST confirmed preferential alignments with *L. infantum* and multiple polymorphisms in non-target species, indicating low probability of cross-amplification. The results underscore that PCR techniques constitute relevant tools for diagnosing asymptomatic canine infection by *L. infantum*. However, the incorporation of these techniques into control programs depends on methodological standardization, validation in different epidemiological scenarios, and integration of molecular, serological, and analytical approaches.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Accuracy; Sensitivity; Specificity; Polymerase chain reaction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de seleção dos estudos incluídos PRISMA.	48
Figura 2 - Resultado do QUADAS-2 demonstrando o risco de viés e as preocupações quanto a aplicabilidade dos estudos selecionados.	54
Figura 3 - Estimativas de especificidade dos métodos de PCR segundo o tipo de teste utilizado.	55
Figura 4 - Estimativas de sensibilidade dos métodos de PCR segundo o tipo de teste utilizado.	56
Figura 5 - Estimativa da acurácia média da PCR para detecção de cães assintomáticos.	57
Figura 6 - Resultados representativos da análise de especificidade dos iniciadores para G3PD obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas família dos tripanossomatídeos.. (B) cruzamento com genoma canino (<i>Canis lupus familiaris</i>). (C) cruzamento com o genoma humano (<i>Homo sapiens</i>). (D) cruzamento com o genoma de <i>Lutzomyia</i> spp.	87
Figura 7 - Resultados representativos da análise de especificidade do iniciador CPB obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas da família Trypanosomatidae. (B) cruzamento com o genoma canino (<i>Canis lupus familiaris</i>). (C) cruzamento com o genoma humano (<i>Homo sapiens</i>). (D) cruzamento com o genoma de <i>Lutzomyia</i> spp.	89
Figura 8 - Resultados representativos da análise de especificidade do iniciador HSP60 obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas da família Trypanosomatidae. (B) cruzamento com o genoma canino (<i>Canis lupus familiaris</i>). (C) cruzamento com o genoma humano (<i>Homo sapiens</i>). (D) cruzamento com o genoma de <i>Lutzomyia</i> spp.	90
Figura 9 - Resultado da análise de PCR <i>in silico</i> realizada no software FastPCR (versão 6.9) Utilizando primers desenhados para o alvo CPB em <i>Leishmania infantum</i> ,	93
Figura 10. Resultado da análise de PCR <i>in silico</i> realizada no software FastPCR (versão 6.9), utilizando primers desenhados para o alvo G3PD em <i>Leishmania infantum</i>	94
Figura 11 - Resultado da análise de PCR <i>in silico</i> realizada no software FastPCR (versão 6.9), utilizando primers desenhados para o alvo HSP60 em <i>Leishmania infantum</i>	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características dos estudos incluídos	49
Quadro 2 - Identificação, sequência, alvo molecular e tamanho esperado dos amplicons dos primers selecionados para <i>L. infantum</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS– Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

bp– Pares de bases

CI– Intervalo de Confiança

cpbE – Variante do gene CPB de *Leishmania infantum*

cpbF – Variante do gene CPB de *Leishmania donovani*

cPCR– Reação em cadeia de polimerase convencional

CPB– Cisteína Protease B

DNA– Ácido desoxirribonucléico

DPP– Plataforma de caminho duplo

dPCR– Reação em cadeia de polimerase digital

ELISA– Ensaio imunoenzimático

G3PD– Gliceraldaído-3-fosfato desidrogenase

GAPDH– Gliceraldaído-3-fosfato desidrogenase

HIV– Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP60– Proteína de choque térmico 60

HSP70– Proteína de choque térmico 70

IFAT– Teste de anticorpos fluorescentes indiretos

ITS-1– Espaçador transcrito interno 1

kDNA– Kinetoplast DNA

L. donovani – *Leishmania donovani*

L. infantum – *Leishmania infantum*

LiTXN1– Triparedoxina citosólica

LV– Leishmaniose Visceral

LVC– Leishmaniose Visceral Canina

Mb– Megabases

MHC– Complexo Principal de Histocompatibilidade

ND– Não declarado

NRAMP1– Proteína 1 de macrófagos associada à resistência natural

OMS– Organização Mundial da Saúde

OPAS– Organização Pan-Americana da Saúde

pb– Pares de bases

PCR– Reação em cadeia da polimerase

PCR-HRM– PCR Análise de Fusão de Alta Resolução

PCR-RFLP– PCR Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição

PI-PLC– Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol

PRISMA– Itens de Relato Preferenciais para Revisões Sistemáticas e Meta-análises

qPCR– Reação em cadeia da polimerase quantitativa

QUADAS– Avaliação da qualidade de estudos de precisão diagnóstica

rK28– Antígeno recombinante K28

rK39– Antígeno recombinante K39

RNA– Ácido ribonucleico

rRNA SSU– RNA ribossômico da subunidade pequena

T. brucei – *Trypanosoma brucei*

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TaqMan– Sonda fluorescente para Reação em cadeia de polimerase em tempo real

TLR-5– Receptor tipo Toll 5

TLR-9– Receptor tipo Toll 9

Tm– Temperatura de fusão

WOAH – Organização Mundial para a Saúde Animal

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. A importância da Leishmaniose visceral	16
2.2. Leishmaniose visceral canina.....	18
2.3. Epidemiologia	20
2.3.1. Distribuição geográfica no mundo da leishmaniose visceral humana.....	20
2.3.2. Contexto epidemiológico da leishmaniose visceral em cães	23
2.4. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	39
1. INTRODUCTION	40
2. METHODOLOGY	42
2.1. Protocol and registration.....	42
2.2. Scope of the study.....	43
2.3. Search strategy	43
2.4. Inclusion criteria	43
2.5. Exclusion criteria	44
2.6. Study selection.....	44
2.7. Data extraction	44
2.8. Risk of bias assessment.....	44
2.9. Statistical analysis	45
3. RESULTS.....	45
3.1. Analytical Approach and Statistical Modeling	52
4. DISCUSSION.....	55
5. CONCLUSIONS.....	61
BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.....	62
TERCEIRA PARTE.....	68
1. INTRODUÇÃO	70
2. REFERENCIAL TEÓRICO	71
2.1. Organização Genômica de <i>L. infantum</i>	71
2.2. Estrutura do genoma nuclear e mitocondrial e plasticidade genômica de <i>L. infantum</i>	72
2.3. Alvo candidato número 1: proteína de choque térmico 60 (HSP60).....	77
2.4. Alvo candidato número 2: cisteína peptidase B (CPB).....	78

2.5.	Alvo candidato número 3: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD).....	79
2.6	Importância das ferramentas de bioinformática	80
2.7	Aplicações práticas e perspectivas futuras	82
3.	OBJETIVO GERAL	84
4.	OBJETIVO ESPECÍFICO	84
5.	METODOLOGIA.....	84
5.1.	Prospecção dos genomas alvos.....	85
5.2.	Identificação de genes ortólogos	85
5.3.	Desenho de iniciadores.....	85
5.4.	Análises termodinâmicas.....	85
5.5.	Avaliação de especificidade	86
5.6.	Simulação e validação da amplificação por e-PCR.....	86
6.	RESULTADOS	86
7.	DISCUSSÃO	96
8.	CONCLUSÃO.....	101
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças infecciosas de caráter sistêmico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao grande grupo Euglenozoa e à família Trypanosomatidae. Essas infecções, apresentam relevância expressiva do ponto de vista clínico e socioeconômico, afetando tanto populações humanas quanto diferentes espécies animais, com destaque para os canídeos domésticos, que desempenham papel fundamental na manutenção do ciclo de transmissão do parasito em ambientes urbanos e periurbanos.

Atualmente, são reconhecidas mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, das quais aproximadamente 20 possuem capacidade comprovada de infectar humanos e outros mamíferos, evidenciando a complexidade biológica e epidemiológica destes parasitos. Entre as diferentes formas clínicas da doença, a leishmaniose visceral (LV) destaca-se por sua gravidade e alta letalidade. A distribuição e a dinâmica epidemiológica da LV variam de acordo com a região geográfica. Em muitos países da Ásia e da África, o principal agente etiológico é *Leishmania donovani*, sendo a doença classificada como antroponose, na qual o ser humano atua como reservatório do parasito. Em contraste, nas regiões da Bacia do Mediterrâneo, nas Américas e em parte da Ásia Central, a LV é causada predominantemente por *Leishmania infantum* (*L. infantum*), configurando-se como uma zoonose, na qual os reservatórios animais assumem papel central na manutenção e disseminação da infecção.

A LV é considerada uma doença negligenciada e está associada a elevados índices de morbidade e mortalidade, especialmente em populações socialmente vulneráveis. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas, expostas ao risco de infecção, com a ocorrência anual de aproximadamente 50 mil novos casos humanos em nível mundial. A ampla distribuição geográfica da doença e a heterogeneidade eco epidemiológica, que abrange regiões do sul da Europa, África, Ásia, América do Sul e América Central, reforçam a necessidade de estratégias integradas e intersetoriais para seu controle e prevenção.

Além disso, a notificação de casos em cães e humanos em áreas previamente consideradas não endêmicas tem despertado crescente preocupação nos âmbitos veterinário e da saúde pública. A movimentação de cães infectados, independentemente de sinais clínicos, entre diferentes regiões geográficas é apontada como um dos fatores que contribuem para a introdução e o estabelecimento da doença em novos territórios, o que ressalta a importância do diagnóstico e do monitoramento desses animais

A transmissão da *Leishmania* ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (Diptera: Psychodidae), principalmente espécies do complexo *Lutzomyia* nas

Américas, que se desenvolvem preferencialmente em ambientes com acúmulo de matéria orgânica. Quando vetores, cães e humanos habitam os mesmos espaços, criam-se condições ideais para manutenção do ciclo de transmissão. Nas Américas, *Lutzomyia longipalpis* é reconhecida como a principal espécie vetora associada à transmissão de *L. infantum*.

No contexto zoonótico da LV, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios urbanos de *L. infantum*, em razão da elevada carga parasitária cutânea que podem apresentar, suficiente para permitir a infecção dos vetores. Essa característica estabelece uma relação direta entre a prevalência da infecção canina e a ocorrência de casos humanos. Estudos epidemiológicos demonstram que aumentos na prevalência de infecção em cães antecedem o surgimento de casos humanos, indicando que a dinâmica de transmissão urbana da LV é fortemente dependente da circulação do parasito na população canina.

A infecção por *L. infantum* em cães apresenta um amplo espectro clínico, variando desde quadros clínicos sintomáticos até infecções assintomáticas. Essa heterogeneidade representa um desafio relevante para o diagnóstico e o controle da doença, uma vez que está associada a múltiplos fatores, como diferenças na resposta imune do hospedeiro, predisposição genética, raça, variabilidade do parasito e presença de coinfeção. Em áreas endêmicas, estima-se que mais de 80% dos cães infectados permaneçam assintomáticos, o que dificulta sua identificação por meio de métodos clínicos e laboratoriais.

Embora cães sintomáticos geralmente apresentem cargas parasitárias mais elevadas, a alta proporção de animais assintomáticos nas populações caninas urbanas contribui de forma significativa para a manutenção do ciclo de transmissão da LV. Evidências experimentais e observacionais indicam que cães assintomáticos são capazes de infectar flebotomíneos, atuando como reservatórios silenciosos do parasito (Laurenti et al., 2013; Scorza et al., 2021). Dessa forma, estratégias de controle baseadas exclusivamente na identificação de animais sintomáticos mostram-se insuficientes para interromper a transmissão.

Nesse cenário, o diagnóstico precoce e preciso da infecção canina, especialmente em animais assintomáticos, torna-se um elemento chave para o controle da LV. No entanto, as ferramentas diagnósticas atualmente disponíveis apresentam limitações importantes. Os métodos parasitológicos, embora altamente específicos, apresentam baixa sensibilidade, sobretudo em cães com reduzida carga parasitária. Por sua vez, os testes imunológicos, amplamente empregados em programas de vigilância, podem resultar em falsos negativos nessa população, além de estarem sujeitos à ocorrência de reações cruzadas que comprometem sua especificidade.

Diante dessas limitações, as técnicas moleculares baseadas na amplificação de ácidos nucleicos têm sido apontadas como alternativas promissoras para o diagnóstico da LV canina (LVC). Entre elas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) destaca-se como um dos métodos mais utilizados em estudos científicos e em laboratórios de referência, em razão de sua elevada sensibilidade analítica. Ela tem a capacidade de detectar quantidades mínimas de DNA parasitário, na ordem de 1 fentograma, o que corresponde aproximadamente a frações de um parasito por microlitro em condições laboratoriais ideais.

Apesar de seu potencial, a acurácia diagnóstica da PCR na detecção de *L. infantum* em cães, especialmente assintomáticos, ainda apresenta resultados heterogêneos na literatura. Diferenças nos alvos moleculares selecionados, nos tipos de amostras biológicas analisadas e nas condições técnicas dos protocolos laboratoriais têm sido apontadas como os principais fatores responsáveis pela variação nos valores de sensibilidade e especificidade, reportados entre os estudos. Essa diversidade metodológica dificulta a comparação direta dos resultados e limita a consolidação de evidências robustas acerca do real desempenho diagnóstico da técnica.

Considerando a relevância epidemiológica dos cães assintomáticos na manutenção da transmissão da LV e a necessidade de métodos diagnósticos mais confiáveis para essa população, o presente estudo teve como objetivo avaliar de forma sistemática a acurácia diagnóstica da PCR na detecção da infecção canina assintomática por *L. infantum*. Para isso, foi conduzida uma revisão sistemática de acurácia diagnóstica com metanálise, integrando dados de sensibilidade e especificidade provenientes de diferentes estudos, com o propósito de fornecer evidências quantitativas consistentes que subsidiem o aprimoramento das estratégias diagnósticas e das políticas de vigilância da LVC. Ademais, este trabalho contempla uma etapa metodológica complementar, voltada à análise *in silico* de iniciadores, apresentada em capítulo específico, com o propósito de contribuir para o aprimoramento racional de ensaios de PCR em tempo real aplicados ao diagnóstico da LVC.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A importância da Leishmaniose visceral

A LV é uma doença infecciosa grave, de evolução crônica e potencialmente fatal, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo *L. infantum* o agente etiológico nas Américas. Atualmente, a LV está classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças tropicais negligenciadas, devido ao seu elevado impacto sobre populações em situação de vulnerabilidade social, associado à escassez histórica de investimentos em

pesquisa, inovação, desenvolvimento de novos fármacos e estratégias de controle eficientes (WHO, 2022).

A distribuição da LV está intimamente associada a fatores socioeconômicos, como ausência de saneamento básico, infraestrutura precária, e dificuldade de acesso aos serviços de saúde, além da presença dos vetores competentes e de animais reservatórios nos contextos zoonóticos da doença (Okwor, 2016). Sua classificação como doença negligenciada reflete não apenas o impacto sanitário, mas também o baixo interesse econômico, o que contribui para a manutenção de elevados índices de morbimortalidade, especialmente em regiões da Ásia, África e América Latina (WHO, 2022).

Em humanos, as manifestações clínicas da LV incluem, predominantemente, febre prolongada, perda de peso progressiva, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Em alguns contextos, a LV também é conhecida como “calazar”, (Varma, 2010). Embora a infecção possa ocorrer na forma assintomática, a doença geralmente apresenta curso crônico e, na ausência de diagnóstico e tratamento oportunos, apresenta grande risco de óbito, especialmente em populações mais vulneráveis (Singh et al., 2014; Piscopo, 2007).

O diagnóstico é frequentemente tardio, uma vez que seus sinais e sintomas são inespecíficos e se sobrepõem a outras doenças infecciosas e hematológicas, dificultando o reconhecimento precoce e contribuindo para a alta letalidade da doença (Chakhunashvili, 2024). Além disso, os tratamentos disponíveis são restritos, associados a elevada toxicidade, efeitos adversos significativos e necessidade de longa duração dos protocolos terapêuticos, o que impõe desafios adicionais na gestão clínica dos pacientes, especialmente em contextos de pobreza e de sistemas de saúde fragilizados (Makau-Barasa et al., 2022; Sundar 2018)

A coinfeção *Leishmania*-HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) constitui um agravante de grande relevância, pois indivíduos com HIV apresentam um risco até 2.320 vezes maior de desenvolver a forma visceral da doença em comparação com indivíduos imunocompetentes (Ezra, 2010). Essa coinfeção acelera a progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), uma vez que ambos os patógenos possuem afinidade por células do sistema mononuclear fagocítico, especialmente macrófagos e células dendríticas, levando à ativação crônica, exaustão imunológica e replicação exacerbada do parasito (Lindoso et al., 2014)

Pacientes coinfectados manifestam formas clínicas mais graves, refratárias, recorrentes e frequentemente atípicas da LV, demandando abordagens diagnósticas e terapêuticas específicas. Além disso, esses indivíduos podem ser altamente infecciosos para os

flebotomíneos, o que representa um importante desafio para as estratégias de controle da transmissão, uma vez que podem atuar como potentes fontes de infecção para os vetores, contribuindo para a manutenção e expansão dos focos da doença (Singh et al., 2024; Silva-Freitas et al., 2025). Nas Américas, o Brasil foi pioneiro na detecção de casos de coinfeção *Leishmania*-HIV, e a incidência continua a crescer, representando um dos maiores desafios para o controle da doença (Sousa-Gomes 2017; Lindoso et al., 2014).

2.2. Leishmaniose visceral canina

Os cães domésticos (*Canis Lupus Familiaris*), são naturalmente infectados pelo vetor, e representam o principal reservatório urbano eficiente de *L. infantum*, atendendo a todos os critérios epidemiológicos para essa função (Dantas-Torres, 2024; Travi et al., 2018). Sua relevância na manutenção do ciclo de transmissão da LVC em áreas endêmicas é sustentada por quatro fatores-chave: Susceptibilidade genética: Cães apresentam maior susceptibilidade à infecção devido a fatores genéticos, como polimorfismos do gene NRAMP1 canino e determinados genótipos de MHC classe II (Ivanescu, 2023); Alto parasitismo cutâneo: A presença de amastigotas na pele é frequente em cães infectados e a carga parasitária específica está fortemente associada à infecção de flebotomíneos. (Courtenay et al., 2014); Proximidade aos seres humanos: A sinantropia canina favorece a interação vetor–hospedeiro, uma vez que, em áreas endêmicas, flebotomíneos realizam respasto sanguíneo com frequência em cães no peri e intradomicílio (Guimarães et al., 2017); Prevalência elevada de assintomáticos: Em áreas endêmicas, uma proporção substancial de cães infectados permanece assintomática, muitas vezes ultrapassando um terço dos animais em alguns locais, os quais conseguem manter a infecção de forma silenciosa por vários anos (Garcia-Castro et al., 2022; Abbehusen et al., 2017).

Em um estudo de xenodiagnóstico, 93% dos cães assintomáticos permitiram a transmissão de *L. infantum* a *Lutzomyia longipalpis*, demonstrando alta importância epidemiológica mesmo na ausência de sinais clínicos (Laurenti et al., 2013). Esses achados corroboram a hipótese de que estratégias baseadas apenas na eliminação de cães sintomáticos são insuficientes para controle epidemiológico (Costa et al., 2013).

O espectro clínico da doença, pode variar desde infecções assintomáticas até formas graves e fatais da doença. Cães infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, atuando como reservatórios silenciosos, ou desenvolver sinais clínicos progressivos. A heterogeneidade clínica é influenciada por fatores imunológicos do hospedeiro, carga

parasitária, coinfeções e variantes genéticas do parasito, o que dificulta o diagnóstico precoce e o manejo clínico eficaz (Ribeiro et al., 2018; Laurenti et al., 2013; Otranto et al., 2009).

Os principais sinais cutâneos observados na LVC incluem descamação, além de lesões nodulares, ulcerativas e pustulares, associadas frequentemente à dermatite esfoliativa. É comum também a ocorrência de alopecia, mucosas pálidas e reações eritematosas. A onicogribose, caracterizada pelo crescimento excessivo das unhas, aparece com frequência e está relacionada à dermatite liquenoide e mononuclear de interface, mesmo na ausência direta dos parasitos (Morales-Yuste, 2022). Comprometimentos oculares, como blefarite, uveíte e conjuntivite, também são frequentemente relatados (Koutinas et al., 2014). Nos cães sintomáticos, a linfadenopatia manifesta-se por linfonodos aumentados devido à hipertrofia nodular como resultado da proliferação de macrófagos (Moreira et al., 2013).

O comprometimento renal é uma complicação frequente, presente na maioria dos casos de cães infectados. A glomerulonefrite, associada à deposição de imunocomplexos, pode evoluir para insuficiência renal, que é uma das principais causas de óbito na doença (Ribeiro et al., 2018). As alterações renais podem começar precocemente, porém os sinais clínicos, como proteinúria e elevação da creatinina sérica, são geralmente evidentes em fases avançadas da infecção (Morales-Yuste, 2022). Distúrbios hemorrágicos, que levam a epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica, também são comuns, resultantes de desequilíbrios na coagulação (Balikci et al., 2023).

A presença de amastigotas no baço está associada à esplenomegalia causada pela infiltração de macrófagos e pela alteração da arquitetura do órgão. Lesões semelhantes podem ocorrer no fígado, com alguns casos evoluindo para hepatite. Durante a infecção, o baço é um dos órgãos mais afetados, apresentando elevada carga parasitária e mudanças morfológicas importantes, como hipertrofia e hiperplasia da polpa vermelha, além de infiltração por células mononucleares e plasmáticas. A polpa branca esplênica sofre substituição de macrófagos por linfócitos, decorrente da hiperplasia e hipertrofia dessa região (Morales-Yuste, 2022).

O baço é um dos locais onde a resposta imune ao parasito será estabelecida, sendo o local onde ocorre a ativação celular contra a infecção. Estudos recentes destacam o envolvimento dos receptores Toll-like TLR-5 e TLR-9 na resposta imune inata esplênica durante a LVC causada por *L. infantum* (Grano et al., 2018).

O fígado também constitui alvo importante do parasito, que invade macrófagos residentes, conhecidos como células de Kupffer, provocando hipertrofia e hiperplasia dessas células parasitadas, além de reações inflamatórias com formação e maturação de granulomas constituídos por macrófagos, células epitelioides, linfócitos e plasmócitos, possivelmente

relacionados ao controle da infecção (Lima et al., 2019). O fígado ainda desempenha funções imunológicas essenciais, como a remoção de patógenos e antígenos da circulação sanguínea, (Morales-Yuste, 2022).

O parasito consegue atingir vários tecidos e órgãos do cão infectado, com destaque para a medula óssea, que abriga grande quantidade de formas parasitárias e favorece a persistência crônica da infecção. Nas fases iniciais da doença, a produção de células sanguíneas na medula tende a se manter preservada, mas o avanço da infecção provoca desequilíbrios como pancitopenia, anemia não regenerativa, hiperplasia histiocítica e hipoplasia eritrocítica, podendo evoluir para aplasia medular. Tais alterações hematológicas são intensificadas devido a lesões esplênicas (Morales-Yuste, 2022; Almeida et al., 2021).

Embora menos frequentemente afetado, o pâncreas pode apresentar baixa carga parasitária na infecção por *L. infantum*. É apontado que esse protozoário pode ser um agente etiológico da pancreatite crônica em cães, com associação a quadros de má condição corporal e caquexia em infecções avançadas envolvendo pâncreas, baço e medula óssea (Morales-Yuste, 2022; Kost et al., 2021).

A letalidade canina é alta na LVC, principalmente na ausência de tratamento ou manejo adequado. Em estudo conduzido na Amazônia brasileira, Carneiro et al. (2023) relatou mortalidade de 100% em um subgrupo de cães com perfil clínico grave que não recebeu intervenção terapêutica precoce.

Além disso, a progressão para insuficiência renal e outras complicações sistêmicas contribui para o desfecho fatal. Por outro lado, cães em fases iniciais da doença, sem alterações renais, apresentam sobrevida superior a quatro anos quando tratados de forma adequada e acompanhados regularmente. Esses resultados evidenciam a importância de adotar estratégias que associem monitoramento clínico contínuo, diagnóstico precoce e terapia oportuna, com vistas a reduzir a morbimortalidade em cães e limitar a transmissão da doença (Ribeiro et al., 2018).

2.3. Epidemiologia

2.3.1. Distribuição geográfica mundial da leishmaniose visceral humana

Embora estejam disseminados ao redor do mundo, cerca de 85-90% dos casos de LV concentram-se em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Na África Oriental e na Índia, a infecção predomina como transmissão antroponótica (*L. donovani*), enquanto na Europa, Américas e Norte da África configura-se predominantemente como zoonose, com reservatórios caninos (WHO, 2025; PAHO, 2024; Scarpini et al., 2022).

Na década de 1980 epidemias devastadoras foram relatadas na África Oriental, e estima-se que aproximadamente 100.000 pessoas morreram durante esse surto, sendo considerado o maior já registrado (Reithinger, 2007). Índia, Nepal e Bangladesh foram países que comumente mantinham mais de 50% da carga global da LV. Dessa forma, em 2005 houve um comprometimento desses países em tentar eliminar esse problema de saúde pública, com metas até o ano de 2015. No entanto, esse prazo precisou ser estendido, demonstrando uma alta complexidade para obter sucesso (Dantas-torres et al., 2024; Singh et al., 2016).

A incidência anual de leishmaniose visceral na África Oriental é estimada entre cerca de 29.400 e 56.700 casos, o que corresponde a aproximadamente 15% da carga global da doença. Esses valores, no entanto, podem oscilar amplamente ao longo do tempo, em virtude de fatores políticos, sociais e ambientais, como guerras civis, instabilidade social, deslocamentos populacionais forçados, migração, irregularidades no regime de chuvas, pobreza e desnutrição, que em conjunto favorecem o surgimento e a reemergência de surtos na região (Alvar et al., 2012; Al-salem, 2016).

Na Europa, a LV apresenta caráter endêmico em todos os países ao sul do continente incluindo Grécia, Itália, Portugal, Espanha e Turquia (Tunali, 2023). As maiores taxas de incidência de LV na Europa concentram-se na região do sul do Cáucaso, especialmente em países como Geórgia e Azerbaijão, e em áreas mediterrâneas, incluindo Espanha, Itália, Grécia e Portugal (Ozbel et al., 2022).

A associação entre leishmaniose visceral e infecção pelo HIV constitui um importante obstáculo ao controle da doença, uma vez que eleva o risco de desenvolvimento de quadros clínicos, favorecendo recidivas, reduz a eficácia terapêutica e contribui para uma maior disseminação da parasita. Na década de 1990, essa coinfeção esteve diretamente relacionada ao ressurgimento da LV no sul da Europa e ainda hoje é motivo de preocupação em saúde pública, sobretudo em países com elevada prevalência de HIV, como Espanha e Portugal (Kantzanou et al., 2023; Tunali, 2023).

Nos países do Norte da África e Oriente Médio, a LV é considerada uma doença emergente ou reemergente, com incidência elevada em focos específicos, sobretudo em áreas rurais marcadas por habitações precárias e vulnerabilidade social, frequentemente associadas a contextos de instabilidade e conflito (Tabbabi, 2019). Nessa região, a combinação de conflitos prolongados e intensa vulnerabilidade socioeconômica tem agravado o cenário da leishmaniose, como ilustrado pela Síria, onde mais de 89 mil casos foram notificados em 2019 em meio ao colapso de serviços básicos e deterioração das condições de vida decorrentes das ofensivas armadas. Situação semelhante é descrita no Iêmen, que entre 2019 e 2020 registrou mais de seis

mil casos de leishmaniose, predominantemente cutânea, em uma população majoritariamente vivendo abaixo da linha de pobreza internacional e com um sistema de saúde severamente fragilizado pela guerra contínua (Knight et al., 2023). As limitações na capacidade diagnóstica e as barreiras de acesso a tratamento, incluindo custos elevados e disponibilidade restrita de métodos e fármacos adequados, permanecem como entraves centrais ao controle efetivo da doença (Hong et al., 2020).

Nas Américas, a situação é particularmente ainda mais concentrada, sendo o Brasil responsável por cerca de 94% dos novos casos registrados com a maior taxa de letalidade atribuída à doença (OPAS, 2022; Cota et al., 2021).

Nos primeiros registros sistematizados, a LV foi descrita como endemia antiga em focos rurais do Nordeste, com transmissão bem estabelecida já na década de 1930, especialmente no Ceará e em outros estados vizinhos (Gontijo, 2004). Até o início de 1950 acreditava-se que a transmissão da LV era exclusivamente rural ou silvestre (Maia-Elkhoury et al., 2008). Nos anos 1980, começou a ficar evidente uma mudança importante na distribuição da LV no Brasil: a doença, antes descrita principalmente como endemia de áreas rurais do Nordeste, passou a ser identificada também em municípios de outras regiões, incluindo periferias urbanas e grandes centros, refletindo um claro processo de urbanização e expansão geográfica (Gontijo, 2004). Ao longo das décadas seguintes, a transmissão deixou de se restringir a poucos focos históricos e foi registrada em um número crescente de unidades da federação. Nos últimos 10 anos, ocorreram em média 3.379 casos por ano no Brasil, distribuídos em 21 dos 27 estados do país (Menegatti, 2024).

Esse avanço territorial não ocorreu de forma acidental. A partir dos anos 1990, estados como Pará e Tocantins, na região Norte, Mato Grosso do Sul, no Centro-Oeste, e Minas Gerais e São Paulo, no Sudeste, passaram a responder por parcela crescente das notificações nacionais, com formação de importantes aglomerados de risco fora do eixo tradicional do semiárido nordestino (Bezerra et al., 2018). Esse movimento reflete tanto a expansão para áreas anteriormente internacionais quanto a consolidação de ciclos urbanos de transmissão, em cenários marcados por crescimento desordenado, presença de reservatórios caninos e adaptação do vetor a ambientes periurbanos (Maia-Elkhoury et al., 2008; Menegatti, 2024)

Existem fatores que foram cruciais no contexto de transição epidemiológica e expansão da LV, como condições precárias de vida e intensos fluxos migratórios de população humana e caninas de áreas rurais endêmicas para periferias urbanas, favorecendo a instalação de ciclos de transmissão em novos ambientes (Maia-Elkhoury et al., 2008; Gontijo, 2004). Assim, o Brasil também já sofreu graves problemas, como em Teresina, Piauí, entre o início da década de 1980

e meados de 1985. Essa foi a primeira grande epidemia urbana no país, com início em 1981, pico em 1984 e Teresina concentrando mais de 60% dos 1.509 casos notificados no estado nesse período (De Almeida Marzochi, 2018; Costa, 1990).

Dados recentes indicam que, embora a incidência nacional de LV seja relativamente estável, permanecem surtos localizados, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste, e estados como Maranhão e Tocantins são atualmente classificados como áreas de risco muito intensas, enquanto a transmissão se mantém em diferentes áreas do Sudeste, incluindo Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (Fiocruz Brasília, 2025; SES-MA, 2025; Brasil, Ministério da Saúde, 2024; SES-TO, 2024).

Em relação ao número de casos humanos nas Américas, o Brasil tem liderado de forma alarmante o número de casos notificados causados por *L. infantum*, sendo resultado de 99% das notificações anuais da América Latina (Vasconcelos et al., 2022). Para compreender a expansão e urbanização da LV, é preciso identificar os fatores de risco associados à infecção humana e/ou canina que corroboram a expansão territorial e manutenção da transmissão da LV (Coura-Vital et al., 2011).

O aquecimento global e o desmatamento afetam diretamente a distribuição da leishmaniose de diversas maneiras. Entre elas, estão as mudanças na biologia do vetor, como por exemplo, mudanças na temperatura que encurtam o ciclo de vida do vetor, a competência vetorial, o aumento da estação de reprodução dos vetores em uma determinada área e a presença deles em áreas onde antes estavam ausentes, tendendo a aumentar a pressão de transmissão. Além disso, os impactos socioeconômicos também são um fator agravante na disseminação da doença, problemas de acesso a cuidados básicos em áreas de conflito, ocupação desorganizada nos arredores de centros urbanos, condições de vida precárias e a falta de infraestruturas básicas, além da íntima convivência com animais domésticos, especialmente cães infectados, criam um ambiente ideal para o ciclo de transmissão da LV (Vilas-Boas et al., 2024; Ximenes et al., 2006).

2.3.2. Contexto epidemiológico da leishmaniose visceral em cães

Na Europa, a LVC é endêmica principalmente em países mediterrâneos como Espanha, Itália, França, Grécia e Portugal. Estima-se que cerca de 2,5 milhões de cães estejam infectados na bacia mediterrânea, com prevalências sorológicas variando de 2% a 30% conforme a região e o método diagnóstico utilizado (Galvéz et al., 2020; Rambolá et al., 2021). Em Portugal, estudos recentes demonstraram altas taxas de infecção em cães, reforçando seu papel como reservatórios subclínicos da doença (Almeida et al., 2022).

Na África Oriental, a LVC foi descrita em países como Sudão, Etiópia e Quênia, onde inquéritos sorológicos e moleculares identificaram cães infectados por *L. donovani* em áreas endêmicas, abordando o envolvimento da população canina como reservatórios em focos zoonóticos (Tedla, 2018). Em determinados cenários, especialmente em comunidades rurais e periurbanas, cães domiciliados e semidomiciliados circulam em ambientes com alta densidade de flebotômíneos, o que favorece sua exposição repetida ao vetor e a manutenção de cadeias de transmissão entre animais e humanos (Segura et al., 2023; Tedla, 2018).

Na América Latina, além do Brasil, países como Argentina, Bolívia, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Uruguai e Venezuela apresentam focos de LVC (Vilas-boas et al., 2024).

No território brasileiro, a LVC encontra-se amplamente distribuída, com focos consolidados em quase todas as regiões e expansão progressiva para novos municípios (De Almeida Marzochi, 2023; Almeida et al., 2021; Silva et al., 2021; Dantas-Torres, 2006). Em um estudo realizado em duas áreas endêmicas, Goiana (Pernambuco) e São Joaquim de Bicas, (Minas Gerais) foi estimado que as incidências anuais de infecção por *Leishmania* spp. em cães, nesses locais, eram de 19,6% e 43,8%, respectivamente, a partir da combinação de métodos sorológicos e de PCR (Dantas-Torres et al., 2024).

O Brasil abriga uma das maiores populações caninas do mundo, com estimativas superiores a 50 milhões de cães domiciliados. Uma parcela significativa desses animais circula livremente nos centros urbanos, condição que contribui para o aumento do risco de transmissão de zoonoses, como LVC. Apesar da relevância desse cenário, o país ainda carece de dados nacionais consolidados sobre a real magnitude da infecção canina. Diante disso, o monitoramento sistemático e o controle dos casos em áreas endêmicas constituem estratégias fundamentais para a redução da disseminação da doença (Junqueira & Galera, 2019; Baquero & Queiroz, 2019; De Carvalho et al., 2018).

Há uma grande dificuldade em conseguir estimar a real prevalência da doença em cães nas Américas, pois a maioria desses animais infectados não apresentam sinais clínicos aparentes, sendo 60 a 80% dos cães assintomáticos (Santos et al., 2021). Há uma estimativa de que a soroprevalência de LVC no Brasil pode variar de 4 a 75%, estando intimamente ligadas a condições geográficas, climáticas e aspectos sociais da área afetada (Vilas-boas et al., 2024). Dessa forma, as políticas de vigilância devem priorizar o rastreamento ativo em populações caninas assintomáticas para mitigar a disseminação.

A íntima convivência entre cães e humanos, especialmente em ambientes urbanos e periurbanos, transforma o cão doméstico em um elo crítico na cadeia de transmissão da LV.

Diferentemente de outros reservatórios silvestres, os cães compartilham espaços físicos, afetivos e ecológicos com seus tutores, o que potencializa sobremaneira a exposição humana ao vetor infectado (Leal-Lima et al., 2021).

Essa proximidade facilita o repasto sanguíneo do flebotomíneo *L. longipalpis* tanto no animal quanto nos moradores das residências, criando um ciclo de transmissão silencioso, persistente e de difícil controle (Rocha et al., 2020). Estudos apontam que, em áreas endêmicas, a detecção de cães infectados antecede o surgimento de casos humanos, confirmando sua relevância epidemiológica e a urgência de estratégias específicas para mitigar esse risco (De Almeida Leal et al., 2014).

2.4. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O manejo da LVC representa um grande desafio, principalmente nos contextos urbanos, onde a densidade populacional canina e a proximidade com o vetor estabelecem condições ideais para a manutenção do ciclo epidemiológico. Esse manejo, é feito historicamente através de políticas públicas implementadas por órgãos governamentais que empregam um conjunto de medidas, incluindo o diagnóstico sorológico de rotina, a eutanásia dos cães infectados, o controle dos vetores por meio de inseticidas e coleiras, e campanhas educativas direcionadas à população (Gomez et al., 2018; Bi et al., 2018; Teixeira-Neto et al., 2014).

Para controlar a expansão da doença e evitar eutanásias desnecessárias, deve haver um diagnóstico preciso e precoce da infecção canina. Porém há entraves para isto. As formas de detecção da infecção em cães se baseiam em três tipos de testes: parasitológicos, imunológicos e moleculares. A performance de todas estas modalidades é seriamente desafiada pela existência de muitos cães infectados e assintomáticos na população os quais possuem baixas cargas parasitárias e níveis discretos de anticorpos séricos anti-*Leishmania*. Isto geralmente incorre em falsos negativos e estes cães passam despercebidos. Além disso os cães podem estar coinfectados com outros parasitos transmitidos por vetores, tornando o diagnóstico ainda mais complexo (Vilas-boas et al., 2024; Ribeiro, 2018; Solano-Galego et al., 2011).

Embora os testes sorológicos constituam uma ferramenta predominante para detecção de cães infectados, sua aplicação apresenta limitações específicas, particularmente em animais assintomáticos. O ELISA (ensaio imunoenzimático) e a imunofluorescência indireta (RIFI) destacam-se entre os métodos mais empregados, ambos baseados na detecção de anticorpos específicos contra *L. infantum* no soro canino (Ribeiro et al., 2019; Nunes et al., 2015; Solano-Galego et al., 2014). Além disso, existem os testes rápidos para detecção de anticorpos ou de antígenos, como o DPP (Dual Path Platform), que tem a vantagem de serem rápidos e práticos,

não necessitando de treinamento técnicos e equipamentos de laboratório para sua execução (Figueiredo et al., 2018).

A preferência por esses testes justifica-se pela relativa simplicidade técnica e custo limitado, porém essa praticidade não se traduz em desempenho diagnóstico adequado para identificação de animais sem manifestações clínicas. Nos cães assintomáticos, a sensibilidade dos testes sorológicos reduz-se substancialmente, variando entre 65,6% para ELISA e 75,7% para DPP. Além disso, esses testes têm a desvantagem de baixa especificidade na detecção de anticorpos e baixa sensibilidade na detecção de antígenos em cães assintomáticos. Em contraste há uma sensibilidade superior a 95% observada em animais sintomáticos, confirmando que a precisão diagnóstica dos testes sorológicos permanece insuficiente para detecção segura de infecções em animais sem sinais clínicos (De Carvalho et al., 2018; Grimaldi et al., 2012). Dessa forma, a sensibilidade dessas técnicas pode variar amplamente, especialmente em cães assintomáticos, devido à baixa produção ou variação temporal dos anticorpos durante a fase subclínica da infecção, ou à soroconversão tardia (Otranto et al., 2009).

Além disso, a especificidade também pode ser comprometida pela reação cruzada com outros tripanossomatídeos, acarretando resultados falso-positivos que dificultam a correta identificação dos animais infectados. A subnotificação destes casos dificulta o controle efetivo, pois a transmissão continua mesmo com a remoção dos cães soropositivos evidentes, o que ajuda a explicar o insucesso persistente das medidas adotadas (Zanette et al., 2014).

Os testes rápidos imunocromatográficos que utilizam o antígeno recombinante rK39 têm ganhado destaque no diagnóstico da LVC, principalmente por serem práticos, de rápida execução e apresentarem baixo custo operacional. O rK39 é uma proteína codificada por um gene relacionado à cinesina de *L. infantum*, com alta imunogenicidade e especificidade para o complexo *Leishmania donovani*. Ele se destaca dos demais antígenos descritos na literatura devido a sua alta capacidade de discriminar pacientes com LV de pacientes saudáveis. Porém sua sensibilidade e especificidade podem variar bastante de acordo com o método diagnóstico que será utilizado e a depender da região geográfica (Siqueira et al., 2021; Medeiros et al., 2021; Maia et al., 2012).

Até o ano de 2011, os testes de triagem e confirmação preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil em levantamentos sorológicos caninos para LV eram, respectivamente, um ELISA (kit EIE-LVC; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) e uma RIFI (kit IFI-LVC; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), ambos utilizando antígenos de promastigotas de *L. major* (Lira et al., 2006).

No entanto esses testes eram considerados imprecisos e o protocolo entre coleta e liberação do resultado era muito longo, cerca de 60 dias. Diante disso, em dezembro de 2011 em virtude das limitações dessas técnicas, esses métodos foram substituídos pelas autoridades de saúde brasileiras por um imunoensaio rápido imunocromatográfico de plataforma de via dupla (DPP®; Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), baseado em uma proteína recombinante (rk28) derivada da expressão de um plasmídeo contendo genes que codificam as proteínas k9, k26 e k39 de *L. infantum*. Esse teste é utilizado como triagem e os resultados que dão positivos são confirmados por ELISA. Sendo o resultado disponível em 15 dias (Marcondes, 2019).

O exame parasitológico é um método diagnóstico direto para a confirmação definitiva da infecção por *L. infantum* em cães, baseado na visualização microscópica do parasito, geralmente na forma de amastigotas, em amostras de tecidos como linfonodos, medula óssea, baço ou pele. A sensibilidade desse exame varia significativamente conforme o tipo e a qualidade da amostra e a experiência do examinador, com taxas em torno de 60% a 80% em cães sintomáticos, mas frequentemente muito mais baixa em cães assintomáticos devido à baixa carga parasitária. Apesar da alta especificidade e do reconhecimento como padrão-ouro para confirmação, o exame parasitológico sofre limitações em detectar casos subclínicos e em estágios iniciais da doença (Reimão et al., 2020; Thakur, 2020; Otranto, 2009).

Além da observação microscópica, o cultivo parasitológico pode aumentar a sensibilidade da detecção, permitindo a multiplicação do protozoário em meios específicos, mas é uma técnica laboriosa, demorada e suscetível a contaminações, o que restringe sua aplicabilidade em rotina diagnóstica (Elmahallawy et al., 2014). Dessa forma, o exame parasitológico, apesar de muito importante para diagnóstico definitivo, deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas para garantir maior sensibilidade e abrangência na detecção da infecção, especialmente em cães assintomáticos (Maurelli et al., 2020; Silva et al., 2014; Otranto, 2009).

Nesse contexto, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) representa uma ferramenta de destaque no diagnóstico da LVC devido à sua capacidade de detectar diretamente o material genético do parasito com alta especificidade e sensibilidade, mesmo em casos de baixa carga parasitária, como ocorre frequentemente em cães assintomáticos (Rihs et al., 2025). Diferentemente dos testes sorológicos, que dependem da resposta imune do hospedeiro e podem resultar em reações cruzadas com outros patógenos e fracasso em animais sem soroconversão ou com imunossupressão, a PCR permite a identificação direta do material genético de *L.*

infantum e complementam de forma importante os exames sorológicos e parasitológicos (Thakur, 2020; Ribeiro et al., 2018; Vilas-Boas et al., 2024).

Estudos demonstram que a PCR pode alcançar sensibilidade próximas ou superiores a 90% em amostras como linfonodo ou medula óssea de cães infectados, enquanto testes parasitológicos diretos têm desempenho mais limitado nessas mesmas condições (Garay et al., 2022; Leite et al., 2010). Essa elevada capacidade de detecção torna a PCR particularmente útil em áreas endêmicas, permitindo identificar precocemente animais infectados, inclusive aqueles clinicamente saudáveis, que têm papel importante na manutenção da transmissão (Ferreira et al., 2013; Reale et al., 1999)

Embora a literatura científica venha demonstrando que as técnicas moleculares superam as demais modalidades diagnósticas em sensibilidade e especificidade no contexto da LVC, mesmo em animais sem expressão clínica, sua acurácia diagnóstica é variável. Isto se deve à existência de diversos protocolos, iniciadores, alvos genômicos, plataformas diagnósticas (Bento et al., 2023; Solcá et al., 2014; Vital et al., 2022; Albulquerque et al., 2017). Porém, diante da grande heterogeneidade dos estudos e de protocolos destas metodologias, sua acurácia é oscilante, o que compromete sua padronização e aplicação em larga escala (Bento et al., 2023).

Estudos mostram que diferentes protocolos empregam uma variedade de alvos moleculares como o DNA cinetoplastídico (kDNA), regiões do gene da *heat shock* protein 70 (hsp70), *small subunit ribosomal* RNA (SSU rRNA), ITS-1 e mini-exon, além de diferenças nos iniciadores, condições de termociclagem e tipos de amostras biológicas (medula óssea, linfonodo, sangue, pele, conjuntiva) (Rihs et al., 2025; Marcelino et al., 2020). Essa diversidade de alvos, codificação de *primers*, plataformas e matrizes clínicas resulta em desempenho diagnóstico bastante heterogêneo entre os ensaios, o que dificulta comparar resultados, estabelecer pontos de corte universais e avançar na padronização dos testes moleculares para uso amplo em programas de vigilância da LVC (Vital et al., 2022; Bento et al., 2023; Marcelino et al., 2020; Albulquerque et al., 2017; Ferreira et al., 2013).

Portanto, sintetizar uma conclusão sobre a acurácia diagnóstica destas técnicas em cães sem expressão clínica da LVC é necessário e relevante para apontar caminhos de melhorias para a prática científica e para o manejo deste agravo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEHUSEN, M. M. C. et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15914, 2017.
- ALBUQUERQUE, A. et al. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 57, 2017.
- ALMEIDA, A. P. et al. The spread of visceral leishmaniasis in Brazil: the first canine cases described in Ji-Paraná, Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e011021, 2021.
- ALMEIDA, M. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Leishmania* infection in dogs from Portugal. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2262, 2022.
- ALMEIDA, A. do B. P. F. de et al. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 156–159, 2009.
- AL-SALEM, W.; HERRICKS, J. R.; HOTEZ, P. J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 460, 2016.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- BALIKCI, C. et al. Coagulation profile alterations in dogs co-infected with visceral leishmaniasis and monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, n. 5, p. 529, 2023.
- BAQUERO, Oswaldo Santos; QUEIROZ, Mariana Ramos. Size, spatial and household distribution, and rabies vaccination coverage of the Brazilian owned-dog population. **Transboundary and emerging diseases**, v. 66, n. 4, p. 1693-1700, 2019.
- BENTO, M. F. et al. Sensitivity of PCR in conjunctival swab samples for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 4, e009423, 2023. DOI: 10.1590/S1984-29612023063.
- BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006697, 2018.
- BI, K. et al. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 9872095, 2018.

CAMPOS, M. P. et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffin-embedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1443-1450, 2017.

CAMPOS, M. P. et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, p. e20160846, 2017.

CARNEIRO, L. A. et al. 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, 2023.

CARDOSO, L. et al. New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 307, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10030307.

CHAKHUNASHVILI, D. G.; CHAKHUNASHVILI, K.; KVIRKVELIA, E. Leishmaniose visceral diagnosticada erroneamente como infecção do trato respiratório superior e anemia ferropriva em um paciente do sexo masculino de 20 meses de idade: um relato de caso. **Journal of Medical Case Reports**, v. 18, p. 37, 2024. DOI: 10.1186/s13256-024-04356-y.

COTA, G. et al. Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009567, 2021.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

COURTENAY, O.; CARSON, C.; CALVO-BADO, L.; GARCEZ, L. M.; QUINNELL, R. J. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2583, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002583.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, D. N. et al. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 229, 2018.

COSTA, D. N. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban area of Southeastern Brazil: ecological and spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 485, 2014.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 198, 2024.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in the Americas: an overview. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-16, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 151–156, 2006.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.

DE ALMEIDA LEAL, Gleisiane Gomes et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 3-4, p. 472-482, 2014.

DE ALMEIDA MARZOCHI, M. C. Leishmaniose visceral: cenários epidemiológicos e desafios. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 77, p. 1–7, 2018.

DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 5, p. 571–576, 2018.

DHOM-LEMOES, L. et al. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): a novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 2019.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240–1242, 1997.

ELMAHALLAWY, E. K, et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961–972, 2014.

EZRA, Navid; OCHOA, Maria Teresa; CRAFT, Noah. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 248-257, 2010.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. de. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: major technological advances and low practical application. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012. DOI: 10.5123/S2176-62232012000200007. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007. Acesso em: 04 dez. 2025.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, 2006.

FERNANDES, M. A. et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 194–202, 2019. DOI: 10.1590/S1984-29612019015.

FIOCRUZ BRASÍLIA. Painéis de indicadores vão fortalecer controle das leishmanioses. Brasília: Fiocruz Brasília, 16 abr. 2025. Disponível em: <https://www.fiocruzbrasil.br/paineis-de-indicadores-vaio-fortalecer-controle-das-leishmanioses/>. Acesso em: 16 dez. 2025.

FIGUEIREDO, Fabiano Borges et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e180260, 2018.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GEISWEID, K.; WEBER, K.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 187–192, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.07.025.

GARAY, Ana Fidelina Gómez et al. Sensitivity comparison for the *Leishmania* spp. detection in different canine tissues using PCR-HRM. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e0069-2022, 2022.

GARCÍA-CASTRO, A. et al. Humoral and cellular immune response in asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis: a review. **Vaccines**, v. 10, n. 6, p. 947, 2022.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004.

GOMEZ SA, et al. Estimating the efficacy of community-wide use of systemic insecticides in dogs to control zoonotic visceral leishmaniasis: A modelling study in a Brazilian scenario. **PLoS neglected tropical diseases**. 2018 Sep 17;12(9):e0006797.

GRANO, F. G. et al. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 253, p. 30–38, 2018.

GRIMALDI JR, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.

GUIMARAES-E-SILVA, A. S. et al. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0179052, 2017.

HONG, A. et al. One health approach to leishmaniasis: understanding the disease dynamics through diagnostic tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020.

HOSSAIN, F. et al. Real-time PCR in the detection and quantification of *Leishmania donovani* for diagnosis and treatment monitoring. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

IVĂNESCU, et l. A resposta imune na leishmaniose canina e humana e como isso influencia o diagnóstico - uma revisão e avaliação de pesquisas recentes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1326521, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1326521.

JUNQUEIRA, Ana Nira Nunes; GALERA, Paula Diniz. Characteristics of the population of dogs and cats in Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 13, n. 2, 2019.

KANTZANO, M. et al. Prevalence of visceral leishmaniasis among people with HIV: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 1–12, 2023.

KOST, W. O. et al. Frequency of detection and load of amastigotes in the pancreas of *Leishmania infantum*-seropositive dogs: clinical signs and histological changes. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 321, 2021.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.

LEAL-LIMA, Adam et al. Tríade canina na Leishmaniose Visceral: Reservatório-vítima-sentinela. **Pubvet**, v. 15, n. 11, p. 1-14, 2021.

LEITE DE SOUSA-GOMES, M.; ROMERO, G. A. S.; WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: are we aware enough? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005772, 2017.

LEITE, Rodrigo Souza et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, 2010.

LIMA, I. S. et al. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 487, 2019.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LIRA, R. A, et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 11–16, 2006.

MACKAU-BARASA, L. K. et al. Moving from control to elimination of visceral leishmaniasis in East Africa. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 965609, 2022.

MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de saude publica**, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MAURELLI, M. P.; et al. Clinical, molecular and serological diagnosis of canine leishmaniosis: an integrated approach. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 2, p. 43, 14 abr. 2020.

MARCELINO, A. P. et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Tropica**, v. 207, p. 105495, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105495.

MANNA, L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 289, 2015.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261–272, 2019.

MATSUMOTO, P. S. et al. Impact of the dog population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in Sao Paulo state, Brazil. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. e0256534, 2021.

MAIA, Z. et al. 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, 2012.

MEDEIROS, F. A. C. et al. Phase II validation study of the rK39 ELISA prototype for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. e00041320, 2021.

MENEGATTI, J. A.; DIAS, Á. F. L. R. Epidemiology of visceral leishmaniasis in municipalities of Mato Grosso and the performance of surveillance activities: an updated investigation. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, p. e015623, 2024.

MESA, L.E., VÉLEZ, I.D., SARAIVA, N.G. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for canine leishmaniasis: systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2021.

MESQUITA, F. B. Custo do tratamento da leishmaniose animal: realidade para os brasileiros? 2022. p. 124. Disponível em: https://sucupiralegado.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=13566671. Acesso em: 17 dez. 2025.

MORALES-YUSTE, Manuel et al. Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9080387.

NARCISO, T. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: a public health problem in expansion. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 3699–3711, 2023.

NUNES, C. M. et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 402–409, 2015.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0408.

OTRANTO, D. et al. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 3, p. 337–343, 2009.

ÖZBEL, Yusuf et al. The current epidemiology of leishmaniasis in Turkey, Azerbaijan and Georgia and implications for disease emergence in European countries. **Zoonoses and public health**, v. 69, n. 5, p. 395-407, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Nº 11. Washington, DC, 11 dez. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>. Acesso em: 18 dez. 2025.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Visceral leishmaniasis. Washington, DC: PAHO, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>. Acesso em: 18 dez. 2025.

PEREIRA, M. G.; GALVÃO, T. F. Heterogeneity and publication bias in systematic reviews. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 775–778, 2014.

PEREIRA, V. F. et al. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104–106, 2016. DOI: 10.1590/0037-8682-0191-2015.

PETERSEN, C. A.; BARR, S. C. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065–1074, 2009.

PISCOPO, T. V.; Mallia Azzopardi, C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007. DOI: 10.1136/pgmj.2006.047340corr1.

ROMBOLÀ, Pasquale et al. Seroprevalence and risk factors associated with exposure to *Leishmania infantum* in dogs, in an endemic Mediterranean region. **PLoS One**, v. 16, n. 1, p. e0244923, 2021.

REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931–2935, 1999.

REIMÃO, J. Q.; COSER, E. M.; LEE, M. R.; COELHO, A. C. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: current and future methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

REITHINGER, R.; BROOKER, S.; KOLACZINSKI, J. H. Visceral leishmaniasis in eastern Africa – current status. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 12, p. 1169–1170, 2007.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 3296893, 2018.

RIHS, J. B. et al. Exploring real-time PCR techniques for diagnosing leishmaniasis: key insights from a systematic review. **Parasitology Research**, v. 124, n. 5, p. 54, 2025.

ROCHA, M. F. et al. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational

study in an endemic area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. e0008079, 2020.

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. 251–262, 2014.

RANGEL, O. et al. Análise da efetividade do uso de coleiras impregnadas com inseticida a 4% para o controle da Leishmaniose Visceral em Mariápolis/SP. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 22, p. e41585–e41585, 2025.

SANTOS, E. W. et al. Abordagem da leishmaniose visceral canina (LVC) por médicos veterinários. **Veterinária e Zootecnia**, v. 28, p. 1–12, 2021.

SCARPINI, S. et al. Visceral leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, p. 1887, 2022.

SCORZA, B. M. et al. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009366, 2021.

SEGURA, G. B. et al. Can domestic dogs be considered a good reservoir of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in an endemic area of nonulcerated cutaneous leishmaniasis in Southern Honduras? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 65, p. e24, 2023.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO MARANHÃO (SES-MA). Maranhão registra 832 casos de leishmaniose em 2024 e 30 mortes pela doença nos últimos dois anos. São Luís: SES-MA, 15 jan. 2025. Disponível em: <https://g1.globo.com/ma/maranhao/noticia/2025/01/15/maranhao-registra-832-casos-de-leishmaniose-em-2024-aponta-a-ses.ghtml>. Acesso em: 16 dez. 2025.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO TOCANTINS (SES-TO). Tocantins tem 166 casos de leishmaniose em 2024, maioria em cidades das regiões Norte e Sudeste do estado. Palmas: SES-TO, 16 jul. 2024. Disponível em: <https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2024/07/16/tocantins-tem-166-casos-de-leishmaniose-em-2024-maioria-e-de-cidades-das-re>. Acesso em: 16 dez. 2025.

SHAW, S. E.; LANGTON, D. A.; HILLMAN, T. J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 281–285, 2009.

SINGH, O. P. et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for Leishmania control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, 2014.

SINGH, O. P. et al. Elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. e304–e309, 2016.

SILVA, D. T. da et al. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 179–186, 2014.

SILVA D.A, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in a vulnerable region in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2021 Sep 6;30(3):e009921.

SILVA-FREITAS, M. L. et al. Insights to the HIV-associated visceral leishmaniasis clinical outcome: lessons learned about immune mediated disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1516176, 2025.

SIQUEIRA, W. F. et al. The increased presence of repetitive motifs in the KDDR-plus recombinant protein, a kinesin-derived antigen from *Leishmania infantum*, improves the diagnostic performance of serological tests for human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009759, 2021.

SOLANO-GALLEGU, L. et al. LeishVet guidelines for practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-86.

SOLANO-GALLEGU, L. ET AL. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 111, 2014.

SOLCA, M. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481–489, 2018. DOI: 10.1017/S0031182017002116.

TABBABI, A. Review of leishmaniasis in the Middle East and North Africa. **African Health Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1329–1337, 2019.

TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 485, 2014.

TEDLA, Dawit Gebremichael. Zoonotic Impact and Epidemiological Changes of Leishmaniasis in Ethiopia: A review. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 4, p. 432-432, 2018.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 2020.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

TUNALI, V.; ÖZBILGIN, A. Knock, knock, knocking on Europe's door: threat of leishmaniasis in Europe with a focus on Turkey. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 4, p. 100150, 2023.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78–82, 2010. DOI: 10.1007/s12288-010-0027.

VASCONCELOS, G. V. et al. Análise epidemiológica dos casos de leishmaniose visceral no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Patologia Tocantins**, v. 9, n. 2, p. 46–52, 2022.

VITAL, T. et al. Detecting *Leishmania* in dogs: a hierarchical-modeling approach to investigate the performance of parasitological and qPCR-based diagnostic procedures. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 12, p. e0011011, 2022.

VILAS-BOAS, D. F. et al. Global distribution of canine visceral leishmaniasis and the role of the dog in the epidemiology of the disease. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 455, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Global Health Observatory data. Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em: 18 dez. 2025.

WHO. Validation of diagnostic assays. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: World Organisation for Animal Health, 2023. Cap. 1.1.6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. [S.l.]: WHO, 2025. Disponível em: http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 19 dez. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 18 de dezembro de 2025.

XIMENES, Maria de Fátima Freire de Melo et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* *chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105–107, 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Artigo formatado nas normas da revista *Preventive Veterinary Medicine*, para o qual será submetido, com JCR 2,4.

Diagnostic accuracy of PCR for asymptomatic canine infection by *Leishmania infantum*: a systematic review and meta-analysis

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis remains a challenging public health burden, particularly due to the presence of asymptomatic dogs that act as silent reservoirs of the etiological agent *Leishmania infantum* in endemic regions. Considering the limitations of traditional diagnostic methods, the Polymerase Chain Reaction (PCR) has been identified as a robust technique. The diagnostic accuracy of PCR and its variations in asymptomatic dogs was evaluated through systematic review and meta-analysis. Thirteen studies were included in the present review. Quantitative PCR (qPCR) showed a mean sensitivity of 90.1% and a specificity of 65.6%, whereas conventional PCR demonstrated higher specificity (92.5%) and a sensitivity of 75.3%. The overall accuracy across the analyzed studies was 77.3% (95% CI: 65.1–86.2), accompanied by substantial heterogeneity. No significant influence of sample type or primer selection on the performance of molecular techniques was observed. The lower specificity of qPCR appears to be associated with its high capacity to detect minimal amounts of DNA in dogs classified as negative by reference tests. The risk-of-bias assessment revealed relevant methodological weaknesses, particularly about a patient selection. The findings indicate that although PCR is sensitive or specific, its performance is heterogeneous in asymptomatic dogs, reinforcing the need for technical standardization and appropriate sample selection in future studies. This research proposes suggestions to improve the diagnosis of this strategic canine population.

Keywords: Subclinical; Polymerase chain reaction; Asymptomatic dogs; Visceral leishmaniosis; Sensitivity; Specificity

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a polymorphic group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which has a major clinical and epidemiological impact on both humans and animals, especially canids (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Burza et al., 2018). More than thirty species of *Leishmania* are recognized, and among them, twenty are considered pathogens (WHO, 2025; Lainson & Shaw, 1998;).

Visceral Leishmaniasis (VL) is a systemic and chronic disease with high lethality and multisector impact, creating challenges that go beyond the health sector, requiring coordination among different areas for its effective control. This is the most severe form of leishmaniasis, and it is endemic in more than seventy countries worldwide and present in regions of southern Europe, Africa, Asia and Latin America (Burza et al, 2018). In addition, new cases have been reported in non-endemic countries, raising significant concern where imported sick or infected dogs constitute a veterinary and public health problem (Marquez et al., 2025; Fujisawa et a, 2021).

In the Mediterranean Basin, the Americas, and Central Asia, the disease is caused by *Leishmania infantum* (*L. infantum*) and it is considered a zoonosis, which inherently establishes the importance of animal reservoirs in the maintenance and transmission of the parasite (Cardoso et al., 2021; Siqueira et al., 2023). In the Americas, *Lutzomyia longipalpis* is the main vector species involved in the transmission of *L. infantum* (Siqueira et al., 2023).

As a neglected disease, VL predominantly affects vulnerable populations. It is estimated that more than 1 billion people live in areas considered endemic and are at risk of infection (Narciso et al., 2023). It is estimated that 50,000 to 90,000 new cases of VL occur worldwide each year, with only 25% to 45% officially reported. (WHO, 2023).

In the zoonotic context of the disease, dogs play a central role as the main urban reservoirs of *L. infantum*, due to their cutaneous parasite load being enough to allow infection of vectors in some cases (Siqueira et al., 2023). Prospective studies document that the occurrence of human cases is preceded by canine cases. This reinforces the need for integrated actions on animal and human health for effective control of VL, which justifies a ‘One Health’ approach.

In dogs, infection can present a variable clinical spectrum, including symptomatic and asymptomatic forms. The latter represents a diagnostic challenge, as it hinders early identification of infection by not raising suspicion, thereby impairing the suitable management of these animals. This clinical heterogeneity is a result of the numerous pathogenic mechanisms involved in the disease process like diversity of immune responses exhibited by each host, breed, genetic variants of the parasite, co-infections, etc. (Francino et al., 2006). In endemic areas, more than 80% of infected dogs are asymptomatic and are not properly diagnosed (Dhom-Lemos et al., 2019).

Asymptomatic dogs are numerous in the canine population and play a central role in maintaining the transmission cycle of *L. infantum*, even though they have relatively lower parasite loads. Part of this population allows the infection of sand flies, acting as silent reservoirs (Laurenti et al., 2013). This dynamic subclinical parasitism in asymptomatic dogs infected with *L. infantum* makes these animals efficient sources of the parasite, favoring the persistence and spread of the disease in urban and peri-urban endemic areas. This highlights the importance of timely and correct diagnosis of these silent reservoirs for the development of integrated, early, and more appropriate surveillance and control strategies (Hide et al., 2024; Segura et al., 2023).

However, currently available diagnostic tools have limitations, especially for identifying infections in asymptomatic animals. Parasitological methods have high specificity

but low sensitivity, especially in asymptomatic animals (Faria, 2012). Immunological tests, widely used in control programs, are limited by the variability of the immune response and often result in false negatives in this population based on detection of recombinant antigens. On the other hand, there is a high possibility of cross-reactions or false positive results when using antibody detection (Ferreira et al., 2012; Morales-Yuste et al., 2022). In this context, molecular diagnosis based on nucleic acid amplification emerges as a promising alternative to conventional methods for detecting *L. infantum*. Polymerase chain reaction (PCR) has established itself as one of the most promising and robust technique for epidemiological research and surveillance, offering substantial theoretical advantages over traditional serological and parasitological methods, standing out as a highly sensitive diagnostic method.

Its application in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis is justified by its ability to identify minimal amounts of DNA in the order of 1 femtogram (fg), equivalent to approximately 0.1 parasite/ μ L, under ideal laboratory conditions (Hossain et al., 2017). However, different studies point to significant variations in the accuracy of this method, mainly attributed to the diversity of: (i) genomic targets, (ii) clinical samples used, (iii) thermocyclers models and (iv) technical protocols (Marcelino et al., 2020; Fernandes et al., 2019).

Although PCR is recognized as the technique with the greatest potential for diagnosing dogs with low parasite loads, due to its supposed greater sensitivity compared to conventional methods. However, its inherent heterogeneity does not provide clarity about its actual diagnostic accuracy, especially in asymptomatic dogs, which are silent maintainers of the parasite transmission cycle.

Considering the strategic epidemiological importance of correctly detecting infection in animals without obvious clinical signs and the potential of PCR and its variants for this purpose, the present study aimed to determine the diagnostic accuracy of this molecular technique in detecting asymptomatic canine infection by *L. infantum*. A systematic review with a meta-analysis of diagnostic accuracy was designed to perform a comprehensive analysis of the literature to synthesize the available evidence.

2. METHODOLOGY

2.1. Protocol and registration

The review was based on the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Page et al, 2021). It was also registered in the

International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (registration number: CRD42025629825).

2.2. Scope of the study

The central question of the review was: What is the available diagnostic performance of Polymerase Chain Reaction in detecting asymptomatic infection by *L. infantum* in dogs? The research question was structured in the PICOT format:

- P (Population): Asymptomatic dogs regardless of age, breed, or sex naturally infected with *L. infantum*.
- I (Intervention/Test of Interest): Polymerase Chain Reaction (PCR).
- C (Comparator/Standard Reference): Parasitological tests (culture or direct microscopy or immunohistochemistry).
- O (Outcome): Sensitivity, specificity, and accuracy.
- T (Type of Study): Diagnostic accuracy.

2.3. Search strategy

To obtain good coverage of eligible studies, independent searches were conducted in the following databases: PubMed, Scopus, Web of Science, Cochrane, and Embase, in the period of October and November 2024

The search strategy combined terms using the Boolean operators AND and OR: ((canine visceral leishmaniasis) OR (canine leishmaniasis)) AND (“Polymerase Chain Reaction” OR “PCR” OR “PCR diagn*” OR “molecular detection” OR “DNA detection” OR "molecular diagn*" OR “qPCR diagn*” OR “quantitative PCR” OR “real time PCR” OR “qPCR” OR “RT-PCR”).

2.4. Inclusion criteria

Cross-sectional studies, cohort studies, or randomized clinical trials that evaluated *L. infantum* infection in dogs were included, covering both prospective and retrospective designs for diagnostic validation of canine VL (CVL). Validation studies at any stage (exploratory, confirmatory, or clinical application) were considered. The included studies were peer-reviewed and published in English, with any publication date up to the year 2024.

2.5. Exclusion criteria

Studies that did not use the reference tests defined in the inclusion criteria for diagnostic confirmation were excluded, as well as studies that did not directly analyze the diagnosis of CLV. Studies that did not clearly present the outcomes of interest (sensitivity, specificity or accuracy) or that investigated leishmaniasis in species other than dogs were also excluded. Studies on other canine diseases that did not evaluate PCR results or explicitly describe the classification of asymptomatic dogs were also eliminated. Finally, systematic reviews and gray literature were also not considered.

2.6. Study selection

The studies were evaluated independently by three reviewers based on reading the title followed by the abstract and the full text. At this stage, disagreements were resolved by at least one more experienced fourth reviewer to get unanimity. The full text was then reviewed to apply the eligibility criteria. Rayyan software was used to screen and organize the identified studies (<https://www.rayyan.ai/>).

2.7. Data extraction

All articles submitted for data extraction were organized in an Excel spreadsheet and underwent a thorough analysis of the full text independently. The main data extracted, including true positives (TP), false positives (FP), true negatives (TN), and false negatives (FN) for calculating of measures of interest (sensitivity, specificity or accuracy) (Table 1). All disagreements were resolved by a more experienced fourth reviewer, at least.

To ensure continuous updating of this systematic review, an automated alert system was implemented in all databases used, with new studies sent automatically by email weekly. One of the reviewers attached the new articles to the Rayyan software. The search, selection, and extraction parameters were identical to those used previously.

2.8. Risk of bias assessment

The QUADAS-2 tool was used (Whiting et al., 2011). The risk of bias for each domain was classified as “low,” “high,” or “uncertain.” A pilot study was conducted previously, using human LV studies for calibration and standardization of all methodological procedures used here.

2.9. Statistical analysis

The sensitivity, specificity, and accuracy measures of the studies were calculated based on the extracted TP, FP, TN and FN values.

The estimates from the different studies were combined using generalized linear mixed models, appropriate for proportions and adopting the logit link function. The random effect component was included to accommodate the heterogeneity between the studies evaluated. The factors type of PCR (quantitative or not), biological sample (practical = use of swabs or equivalent, obtaining peripheral blood; or invasive = biopsies, scrapings or bone marrow or lymph nodes aspiration), and primer types were considered as fixed effects, allowing the evaluation of the influence of these characteristics on diagnostic accuracy.

The model selection followed was based on the criterion of parsimony, favoring the explanation of the largest proportion of variance with the fewest terms, always considering the biological and epidemiological relevance of the retained variables. The effects were tested by analyzing deviations with a significant level of 5%. All analyses were conducted using R software (version 4.5.1) (R Core Team, 2016), using the lme4 and emmeans packages (Bates, 2015; Lenth, 2023).

3. RESULTS

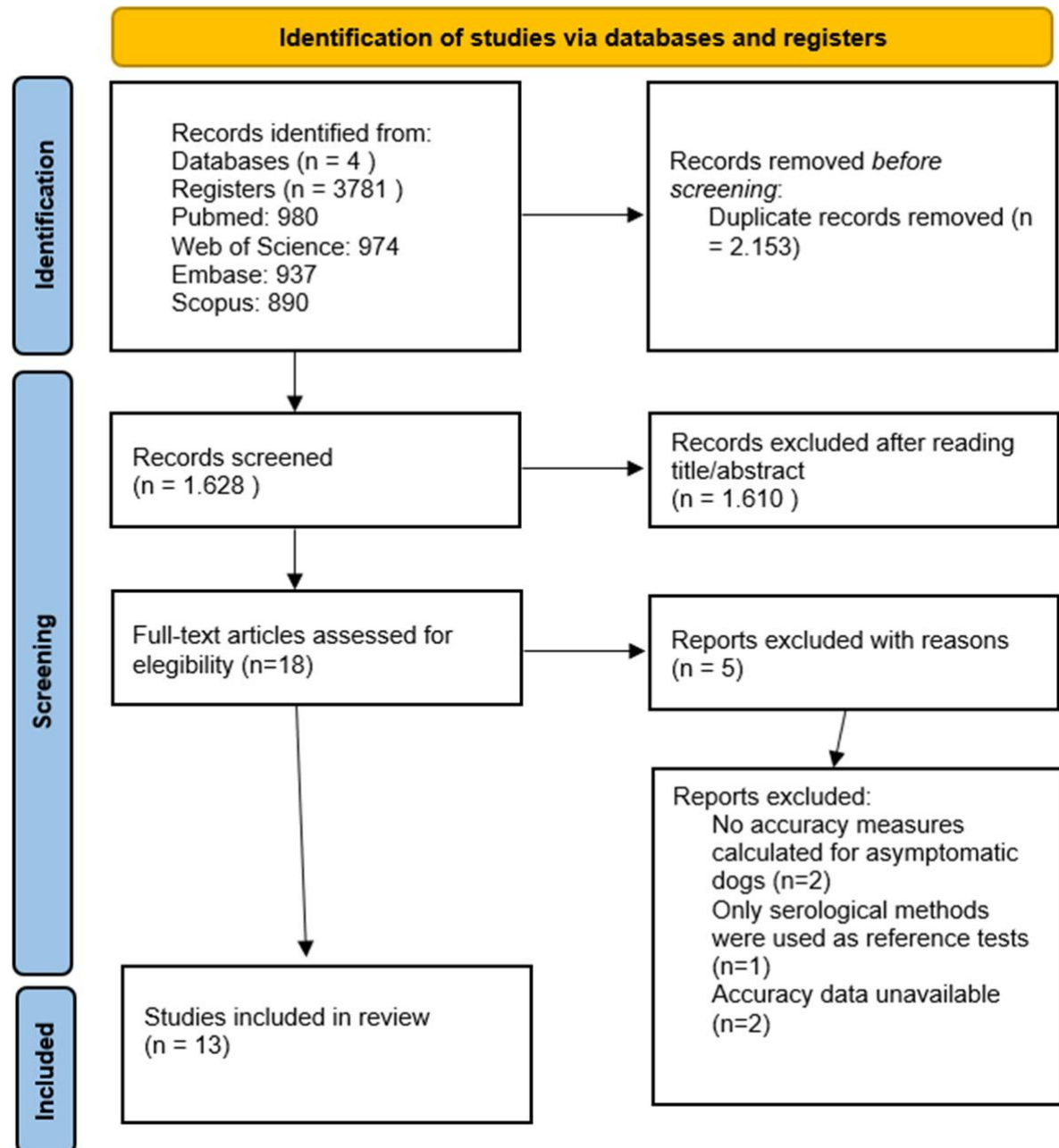
The database search yielded 3,781 records, of which 2,153 were duplicates, with 1,628 forwarded for screening according to pre-established criteria. Studies were excluded if they did not meet at least one of the inclusion criteria. At the end of data extraction, 13 studies were included in the meta-analysis (Figure 1).

The countries where the studies were conducted were: Brazil, Tunisia, and Italy. Some studies conducted more than one diagnostic evaluation, totaling 33 independent analyses of the index test. The molecular methods recorded were: qPCR, conventional PCR, PCR with hybridization, and nested PCR.

Biological samples varied across studies, including peripheral blood, lymph nodes, bone marrow, spleen, skin, and mucosal swabs. The most frequently used genetic target was kinetoplast DNA (kDNA), with some studies using genomic nuclear sequences.

All included studies were cross-sectional, except for one longitudinal study. Only one study used a Bayesian statistical approach, while the others employed frequentist methods. The main characteristics of the studies are compiled in Frame 1, providing an overview of the main

Figure 1. Flowchart of included studies.



Frame 1 - Characteristics of the selected studies

Study	Reference	Index test and Clinical Sample	Sample size (number of dogs)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Accuracy (95% CI)	TP	FP	FN	TN	Target	Primers
1	Caldas et al., 2020 (a)	qPCR (bone marrow)	21	54.55% (23.38-83.25)	100% (69.15-100)	76.19% (52.83-91.78)	6	0	5	10	kDNA	Leish -F/Leish-R:
1	Caldas et al., 2020(b)	qPCR (popliteal lymph node)	21	72.73% (39.03-93.98)	100% (69.15-100)	85,71% (63.66-96.95)	8	0	3	10		
1	Caldas et al., 2020(c)	qPCR (conjunctival swab)	21	54.55% (23.38-83.25)	100% (69.15-100)	76.19% (52.83-91.78)	6	0	5	10		
2	Chargui et al., 2009	cPCR (Blood)	40	ND	80% (64.35-90.95)	80% (64.35-90.95)	0	8	0	32	gene SSU rRNA	LEI70R e LEI70L

Frame 2 - Characteristics of the selected studies (Continuation).

3	Ferreira et al., 2012 (a)	cPCR-hyb (conjunctival swab)	50	85.71% (69.74-95.19)	66.67% (38.38-88.18)	80% (66.28-89.97)	30	5	5	10	kDNA	Forward: 5'- GGG(G/T)AGGGGCGTTC T(G/C)CGAA-3' Reverse: 5'- (G/C)(G/C)(C/G)CCA(C/A) CTAT(A/T)TTACACAAC CCC-3'
	Ferreira et al., 2012 (b)	cPCR-hyb (bone marrow)	50	54.29%(36.5-71.17)	93.33%(68.05-99.83)	66%(51.23-78.79)	19	1	16	14		
	Ferreira et al., 2012 ©	cPCR-hyb (skin)	50	51.43%(33.99-68.62)	100% (78.2-100)	66%(51.23-78.79)	18	0	17	15		
	Ferreira et al., 2012(b)	cPCR-hyb (Blood)	50	31.43% (16.85-49.29)	100% (78.2-100)	52%(37.42-66.34)	11	0	24	15		
4	Gomes et al., 2007	cPCR (lymph node or skin)	70	86.96% (66.41-97.22)	91.49%(79.62-97.63)	90%(80.48-95.88)	20	4	3	43	kDNA	RV1 (sense)/ RV2 (antisense)

Frame 3 – Characteristics of the selected studies (Continuation).

5	Leite et al., 2010 (a)	nPCR (conjunctival swab)	36	83.3% (65.28-94.36)	100% (54.07-100)	86,11% (70.5-95.33)	25	0	5	6	ITS-1do gene rRNA	Primers (1ª rodada): Forward: 5'-CTGGATCATTTCGGATG-3' Reverse: 5'-TGATACCACTTATCGCAC TT-3'
	Leite et al., 2010 (b)	nPCR (skin)	36	50% (31.3-68.7)	100% (54.07-100)	58,33%(40.76-74.49)	15	0	15	6		Primers (2ª rodada):Forward: 5'-CATTTCGATGATTACACC-3' Reverse: 5'-CGTTCCTTCAATGAATAG G-3
	Leite et al., 2010 ©	nPCR (blood)	36	56.67%(37.43-74.54)	100% (54.07-100)	63.89%(46.22-79.18)	17	0	13	6		
	Leite et al., 2010 (d)	cPCR-hyb (conjunctival swab)	36	90% (73.47-97.89)	100% (54.07-100)	91.67%(77.53-98.25)	27	0	3	6	kDNA	Forward: 5'-(G/C)(G/C)(C/G)(C/A)CTAT(A/T)TTTACACCAACCCC-3' Reverse: 5'-GGGCAGGGGCGTTTGCGA AA-3'
	Leite et al., 2010 (e)	cPCR-hyb (skin)	36	56.67%(37.43-74.54)	100% (54.07-100)	63.89%(46.22-79.18)	17	0	13	6		
	Leite et al., 2010 (f)	cPCR-hyb (Blood)	36	13.33%(3.76-30.72)	100% (54.07-100)	27.78%(14.2-45.19)	4	0	26	6		
6	Moreira et al., 2007	cPCR (lymph node)	49	95.65%(78.05-99.89)	100% (86.77-100)	97,96%(89.15-99.95)	22	0	1	26	kDNA	13A (sense)/ 13B (antisense)
7	Nunes et al., 2015	cPCR (Blood)	27	87.5% (47.35-99.68)	21.05%(6.05-45.57)	40.74%(22.39-61.20)	7	15	1	4	kDNA	13A (sense)/ 13B (antisense)

Frame 4 - Characteristics of the selected studies (Continuation).

8	Queiroz et al., 2011	cPCR (skin)	8	100% (39.76-100)	0%(0-60.24)	50%(15.07-84.30)	4	4	0	0	kDNA	13A (sense)/ 13B (antisense)
9	Ramos et al., 2013 (a)	qPCR (bone marrow)	6	100% (15.81-100)	75% (19.41-99.37)	83.3%(35.88-99.58)	2	1	0	3	kDNA	LEISH-1 /LEISH-2
	Ramos et al., 2013 (b)	qPCR (lymph node)	6	100% (15.81-100)	75% (19.41-99.37)		2	1	0	3		
	Ramos et al., 2013 ©	qPCR (spleen)	6	100% (15.81-100)	75% (19.41-99.37)		2	1	0	3		
10	Reis et al., 2013 (a)	cPCR (skin)	20	66.67%(29.93-92.51)	45.45%(16.75-76.62)	55% (31.53-76.94)	6	6	3	5	kDNA	L150/L152
	Reis et al., 2013 (b)	cPCR (spleen)	20	55.56%(21.2-86.3)	45.45%(16.75-76.62)	50%(27.02-72.8)	5	6	4	5		
	Reis et al., 2013 (c)	sPCR (skin)	20	55.56%(21.2-86.3)	54.55%(23.38-83.25)	55% (31.53-76.94)	5	5	4	6	kDNA	LINR4 (forward)/LIN17 (reverse – primeira reação)/LIN19 (reverse – segunda reação snPCR)
	Reis et al., 2013 (d)	sPCR (spleen)	20	77.78%(39.99-97.19)	45.45%(16.75-76.62)	60%(36.05-80.88)	7	6	2	5		
	Reis et al., 2013 (e)	qPCR(skin)	20	88.89%(51.75-99.72)	9.09%(0.23-41.28)	45%(23.06-68.47)	8	10	1	1	Gene da DNA polimerase α	Forward: TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG Reverse: GCA TCG CAG GTG TGA GCA C
	Reis et al., 2013 (f)	qPCR (spleen)	20	100% (66.37-100)	0% (0-28.49)	45%(23.06-68.47)	9	11	0	0		

Frame 5 - Characteristics of the selected studies (Continuation).

11	Silva et al., 2024	qPCR (skin in formalin)	17	82.35%(56.57-96.2)	0(100)	82.35%(56.57-92.2)	14	0	3	0	kDNA	LEISH-1/LEISH-2
12	Solcá et al., 2012 (a)	cPCR (spleen)	23	100% (2.5-100)	85.71%(42.13-99.64)	87.5%(47.35-99.68)	1	1	0	6	kDNA	(RV1) / (RV2).
	Solcá et al., 2012 (b)	qPCR (spleen)	23	100% (2.5-100)	100% (59.04-100)	100%(63.06-100)	1	0	0	7	kDNA	Primer 5 (LEIF)/Primer 3-(LEIR)
13	*Vital et al., 2022 (a)	qPCR (blood)	207	52.15	0.0415 (standard error)	ND	108	99	ND	ND	kDNA	LEISH-1/LEISH-2:
	*Vital et al., 2022 (b)	qPCR (bone marrow)	170	52.54	0.0386 (standard error)	ND	89	81	ND	ND		
	*Vital et al., 2022 (c)	qPCR(conjunctival swab)	158	51.44	0.0447 (standard error)	ND	81	77	ND	ND		

kDNA = kinetoplast DNA; SSU rRNA = ribosomal small subunit RNA gene.

ITS-1 rRNA = Internal transcribed spacer of the ribosomal RNA gene.

cPCR: Conventional PCR

qPCR: Quantitative real-time PCR

Hyb: Hybridization

CI: Confidence interval

ND = Not declared

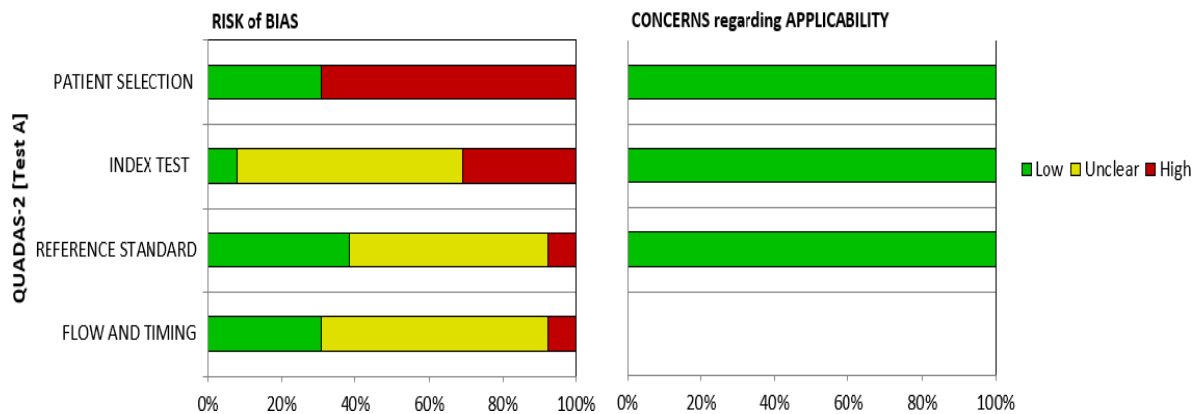
*The authors used only the standard error

All the studies used a significant level of 5%

Throughout the design of this study, the review was continuously updated, prospecting for possible new articles. Thirty-three studies were received during this period and screened. None of them became eligible according to the inclusion criteria adopted.

The risk of bias analysis showed a preponderance of high risk for the patient selection domain (69%). The remaining studies were considered low risk. For the other domains, there was a predominance of articles with uncertain risk, followed by high risk for the index test domain and low risk for the reference tests and flow and time domains. For all articles, concerns about the applicability of the studies were low (Figure 2).

Figure 2. QUADAS-2 results showing the risk of bias and concerns about the applicability of the selected studies.



During the data extraction stage, only one of the thirteen studies (7.7%) was found to comply with STARD guidelines. This limits the complete assessment of the methodological quality of the studies and increases the risk of bias.

3.1. Analytical Approach and Statistical Modeling

For each analysis, a 2×2 contingency table was constructed based on the values of true positives, false positives, true negatives, and false negatives. These tables served as the basis for calculating diagnostic accuracy measures: sensitivity, specificity, and overall accuracy.

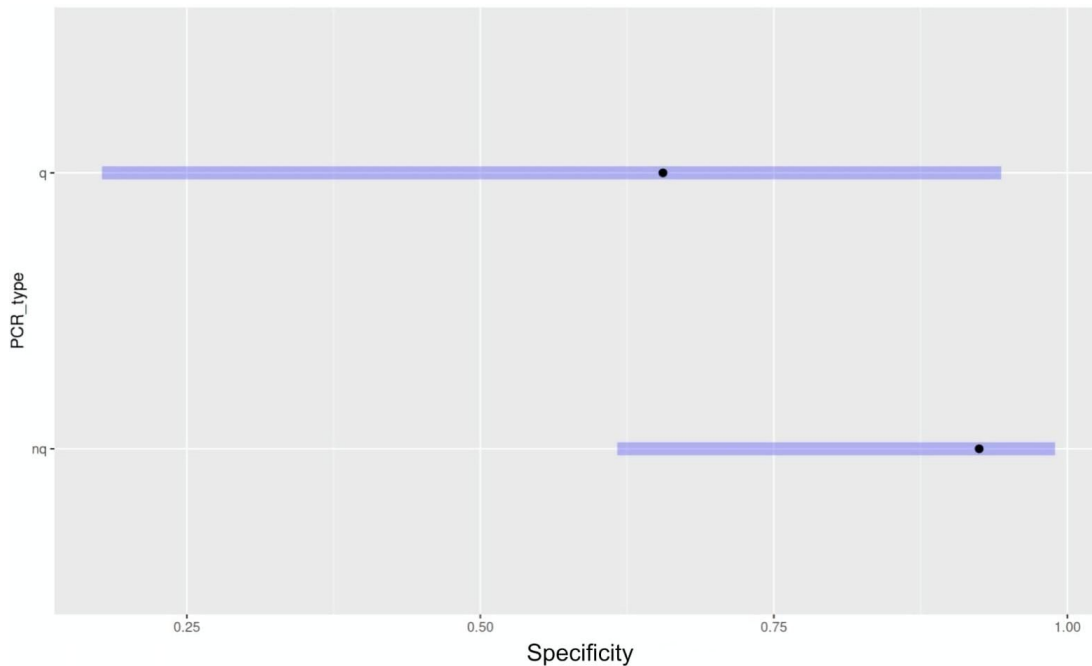
The sensitivities observed in the studies ranged from 13.33 to 100%, while the specificities ranged from 21.1% to 100%. The overall accuracy varied between 27,78 to 97.96% for each study.

To allow for a more structured interpretation of the findings, the analyses were organized into subgroups according to type of PCR used (quantitative and non-quantitative), type of clinical samples (practical and invasive), and primers used (targeted to the mitochondrial or nuclear genome). The practical clinical samples were swabs or blood. Invasive samples were biopsies, bone marrow or lymph node aspiration.

The likelihood ratio test with chi-square distribution, applied specifically to the specificity outcome, revealed substantial heterogeneity between studies. When investigating the influence of covariates, it was observed that the type of PCR had a significant effect on specificity: non-quantitative PCR had significantly higher specificity than qPCR ($p = 0.0404$).

No significant differences in specificity were identified when studies were grouped according to clinical sample type or primer type ($p > 0.05$). The estimated mean specificity for non-quantitative PCR was 92.5% (95% CI: 61.7%–98.9%), while qPCR had a mean of 65.6% (95% CI: 17.8%–94.4%). Detailed estimates can be viewed in the specificity subgroup (Figure 3).

Figure 3. Specificity estimates according to the type of PCR used. Each point represents the mean specificity estimate for the subgroup, and the lines correspond to the respective 95% confidence intervals. q = quantitative real-time PCR; nq = conventional or non-quantitative PCR.

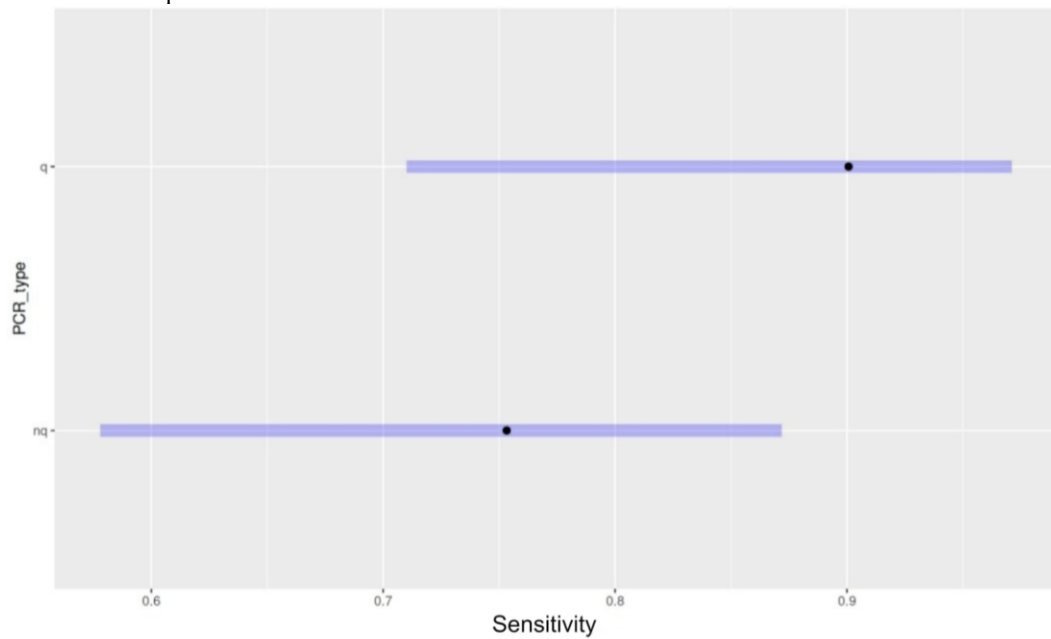


For the sensitivity outcome, less variability was observed among the included studies, indicating that PCR methods performed consistently in detecting infected dogs, even in the face of methodological differences between studies.

When evaluating the influence of covariates, there was no statistical difference between PCR types (quantitative vs. non-quantitative). Similarly, the type of clinical sample and primers used had no significant impact on test sensitivity ($p > 0.05$).

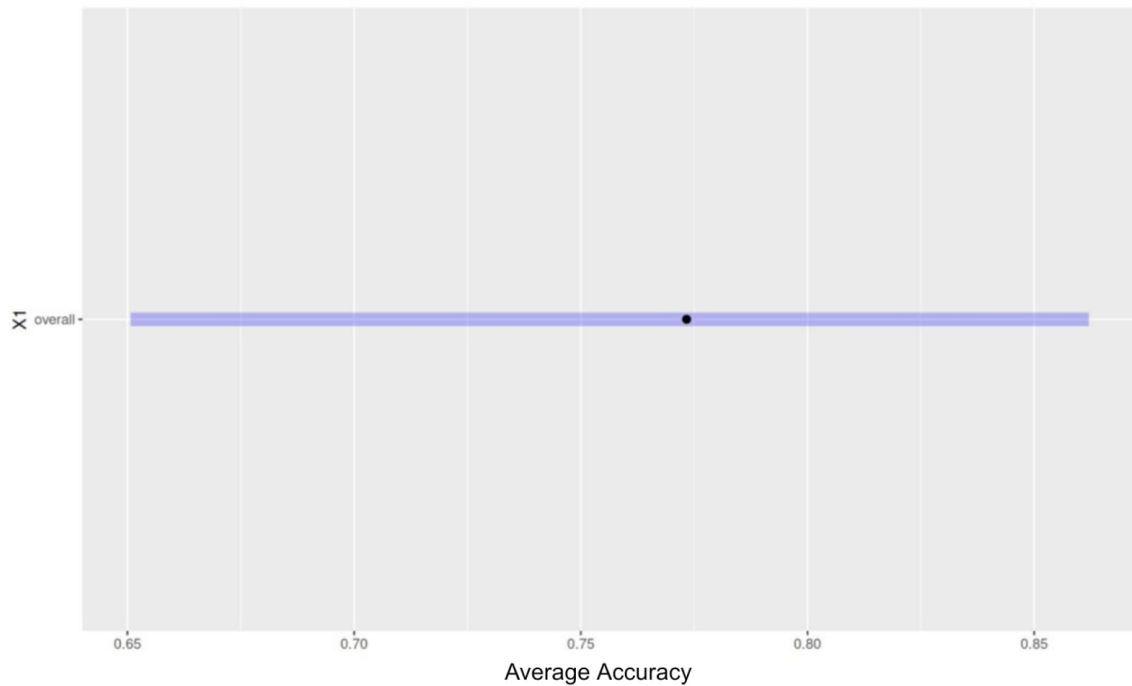
The meta-analysis result for the estimated mean sensitivity for qPCR was 90.1% (95% CI: 71.0%–97.1%), while non-quantitative PCR had a mean of 75.3% (95% CI: 57.8%–87.2%). The results can be seen in Figure 4.

Figure 4. Sensitivity estimates according to the type of PCR used. Each point represents the mean sensitivity of the subgroup, while the lines indicate the 95% confidence intervals. q = quantitative real-time PCR; nq = conventional or non-quantitative PCR.



For the accuracy metric, no evidence of a differential effect was found for any of the covariates evaluated (PCR type, sample type, or primers). The mean pooled accuracy of all studies was 77.3% (95% CI: 65.1%–86.2%). This measure reflects the proportion of all results (positive and negative) that were correct in relation to the reference standard (Figure 5).

Figure 5. Estimated mean accuracy of PCR for detection of asymptomatic dogs. The dot indicates the adjusted mean accuracy, and the horizontal band represents the 95% confidence interval.



4. DISCUSSION

The present study objectively answered the proposed question, demonstrating more clearly the sensitivity, specificity and global accuracy. These findings summarize the general pattern observed among the studies and offer a consolidated interpretation of the available diagnostic performance of the methods evaluated in the molecular diagnosis for asymptomatic canine infection.

The consistency of the results obtained in this review stems from the judicious use of consolidated methods for diagnostic accuracy studies, such as the PRISMA-DTA guidelines (McInnes et al., 2018; Salameh et al., 2020). The search strategy was broad, well-structured, and continuously updated (Garner et al., 2016; Cumpston, 2024). Maintaining a continuous search is essential to ensure the credibility and timeliness of the review (Garner et al., 2016). The selection of studies followed predefined criteria, applied in a standardized manner and with triple verification, strengthening the rigor of the methodology. Double verification in the selection of studies is a recommended practice that increases the accuracy of the inclusion process (Stoll et al., 2019), which was performed in the present review.

Data extraction was conducted using organized and previously tested forms, and the risk of bias was analyzed using the QUADAS-2 instrument, widely accepted as a reference in the field (Whiting et al., 2011). Together, these procedures reinforce that the conclusions of this

review are the result of a clear, careful methodological process aligned with current scientific quality recommendations.

The studies included in this review presented a wide methodological diversity, involving different types of PCR (conventional, qPCR, nested, and PCR with hybridization), various clinical samples, and different targets of the *L. infantum* genome. Despite this heterogeneity, a recurring pattern was observed among the studies: PCR demonstrated overall superior performance to the parasitological and serological methods used as references, especially in asymptomatic dogs (Morales-Yuste et al., 2022; Rihs et al., 2025).

Sensitivity, specificity, and accuracy showed wide dispersion (broad confidence intervals), evidencing heterogeneity among the studies and reflecting differences in protocols, sample quality, and the operational definition of outcomes. These general findings serve as a basis for the integrated interpretation of the quantitative results obtained in the meta-analysis. The statistical analysis was performed using a generalized mixed random effects model (Reitsma et al., 2005) appropriate for scenarios in which different factors influence the performance of the tests evaluated (Deeks, 2024). This model was specifically chosen because it allows for the joint estimation of sensitivity and specificity, accounting for interdependence between these measures (Reitsma et al., 2005). The heterogeneity observed between studies reflects clinical, methodological, and statistical differences that justify the use of random effects (White et al., 2024).

This behavior was already expected due to the intrinsic nature of diagnostic studies. Part of this heterogeneity can be attributed to the small sample sizes present in several studies: when samples are small, the sampling error in the reported variances and their variances within the study tend to be high, resulting in unstable estimates and wider confidence intervals (Lin, 2018).

In addition, methodological diversity among studies, including differences in the type of sample used (blood, bone marrow, lymph node, conjunctival swab), variations in primers and genetic targets employed, as well as the use of different PCR platforms, contributes substantially to the dispersion of results (White et al., 2024). Thus, subgroup analysis became necessary to explore these sources of variability and obtain more robust and specific interpretations, as recommended for meta-analysis that include studies with high heterogeneity (Pereira, 2014; Sousa, 2009).

The assessment of bias risk using the QUADAS-2 tool revealed significant methodological weaknesses. In the domain of patient selection, 69% of studies presented a high risk of bias, predominantly due to the use of convenience sampling. Although this strategy facilitates the logistics of researchers, it tends to overestimate accuracy measures, as it selects

animals known to be infected and known to be healthy, a reality that does not correspond to the routine clinical setting, where infectious status is unknown. This mismatch can result in overestimation of both sensitivity and specificity (Leeftang et al., 2008).

For the other domains, “uncertain” risk classifications predominated (92.3% of studies), reflecting a lack of methodological transparency in the reports. About the index test and reference test, clear description is essential: the index test (PCR) should ideally be conducted without knowledge of the gold standard results, and vice versa, a practice that reduces interpretation biases. This information was often not stated in primary studies. Similarly, in the flow and time domain, there was a lack of reporting on the interval between tests, a critical aspect, as prolonged periods can allow changes in the infectious status of animals, artificially influencing the results. These gaps reflect low adherence to STARD guidelines (Bossuyt et al., 2015), compromising the transparency necessary for the reader to adequately assess methodological quality.

Despite the methodological risks identified, the judgment regarding applicability concerns was favorable, as all studies were classified as low concern. This indicates that, although there are some limitations in execution and reporting, the populations and contexts evaluated remain appropriate to the review question.

Another relevant methodological finding was the low adherence of primary studies to STARD guidelines, with only one referencing their use. Lack of adherence to STARD compromises reporting transparency and is directly associated with “uncertain risk” judgments in the QUADAS-2 assessment. When critical information is not reported, such as a complete description of the index test, reference standard, and patient flow, evaluators are unable to adequately judge whether there is a risk of bias, leading to uncertainty ratings (Cohen et al., 2016; Whiting et al., 2011).

Given the search for more sensitive molecular tests to diagnose CVL in recent years, the challenge remains to detect the parasite in asymptomatic dogs, which tend to have reduced parasite loads (Duncan et al., 2025). In the specific context of this meta-analysis, focused on asymptomatic dogs, a great obstacle in the control of CVL, the results do not point to a single clearly superior test. What is observed is that different PCR approaches have their own advantages and limitations, distinctly influencing the ability to detect the infection or to safely exclude it. Thus, understanding these methodological differences is essential to properly interpret the performance of the tests evaluated and to justify their application in large-scale clinical situations.

Regarding the results on the type of PCR, the lower specificity observed for qPCR compared to conventional PCR can be explained by the highly sensitive nature of this technique (Valasek, 2005). According to MIQE guidelines, qPCR can detect minimal amounts of target DNA through real-time detection (“cycle-by-cycle detection”) (Bustin et al., 2009).

This ability to identify extremely low levels of genetic material increases the number of positive results. This often results in dogs testing positive by qPCR but negative by less sensitive reference tests, artificially reducing apparent specificity (Campos et al., 2017; Marques et al., 2012).

Conventional PCR, on the other hand, depends on the visualization of the amplified product in agarose gel, which requires larger amounts of DNA for detection (Paiva-Cavalcanti, 2010). This requirement acts as a filter that reduces false positives compared to qPCR. Because qPCR detects extremely small amounts of DNA, less than one parasite cell in some cases (references), it provides more positive results than conventional PCR, particularly in dogs with very low parasite load. This greater sensitivity generates disagreement: dogs that are positive by qPCR but negative by microscopy or culture, resulting in an apparent reduction in specificity compared to the imperfect reference test (Campos et al., 2017; Marques et al., 2012).

Another critical point is precisely this imperfection of the reference standard. Parasitological examination, historically used to classify the true infection status, has low sensitivity in subclinical cases, although it maintains high specificity (Campos et al., 2017). Thus, dogs that are actually infected may be classified as negative by the reference test but positive by qPCR. When this occurs, the discrepancy artificially reduces the apparent specificity of qPCR. In scenarios such as this, the use of alternative models is recommended, such as latent class analysis (LCA), which does not depend on a single reference standard (WOAH, 2023).

Regarding the sensitivity of the different types of PCR, the results showed a different pattern from that observed for specificity. There was a trend toward higher sensitivity for qPCR (90.1%) compared to conventional PCR (75.3%), but this difference did not reach statistical significance.

Although not statistically significant, the 90.1% sensitivity for qPCR has substantial clinical relevance. It is important to distinguish that statistical significance and clinical relevance are different concepts: while small differences may be statistically significant in large samples, clinically important differences may not reach statistical significance in small samples (Esterhuizen et al., 2025; Ranganathan, 2015).

In this case, the lack of statistical significance likely reflects Type II error resulting from the small sample sizes of the primary studies, which compromise statistical power

(AbdulRaheem, 2024). Therefore, the robustness of sensitivity findings is best assessed by considering both the magnitude of the difference (90.1% vs. 75.3%) and the clinical context, not just the isolated p-value.

Galluzzi et al. (2018) found that qPCR in the diagnosis of visceral leishmaniasis had sensitivities between 91.3% and 100%, indicating the usefulness of qPCR in terms of sensitivity, reinforcing that the performance found in our study is clinically relevant. The sensitivity of 90.1% observed for qPCR in this meta-analysis demonstrates a potential performance for epidemiological surveillance of CVL. This finding corroborates Cunha et al. (2014), who identified kDNA qPCR as particularly effective in detecting samples with low parasite load. In identifying asymptomatic dogs, the ability of qPCR to detect 90% of true cases offers a substantial advantage over conventional serological tests, which have reduced sensitivity and cross-reactions with trypanosomiasis and cutaneous leishmaniasis (Ferreira et al., 2013).

However, the wide confidence interval (95% CI: 71.0%–97.1%) associated with this sensitivity indicates great methodological variability between studies, suggesting that this performance is not consistent across all protocols. Despite this heterogeneity, the demonstrated ability of qPCR to achieve high sensitivity makes it particularly useful for detecting subclinical infections, allowing for the identification and proper management of asymptomatic positive dogs, which is fundamental for control strategies. Therefore, this variability highlights the critical importance of more rigorous studies to standardize the qPCR protocol, ensuring reproducibility and reliability in different contexts.

qPCR also offers significant operational advantages. The absence of post-amplification procedures in qPCR reduces the risk of cross-contamination, making this technique more reliable. In addition, the automated and scalable nature of qPCR allows for the efficient processing of large numbers of samples simultaneously, representing a huge advantage for screening studies and large-scale epidemiological analyses (Grembi et al., 2020).

However, the implementation of qPCR has practical limitations: it requires expensive laboratory equipment and personnel trained in data interpretation (Ferreira et al., 2012). Therefore, the choice between conventional PCR and qPCR for the diagnosis of *L. infantum* in asymptomatic dogs must consider the local epidemiological context, its advantages, and limitations.

The overall accuracy of 77.3% (95% CI: 65.1%–86.2%) reflects the heterogeneity between the different performances of the techniques observed in this meta-analysis. The wide confidence interval mainly indicates that small sample sizes in the primary studies contribute

to variations in accuracy among studies (Leeflang et al., 2008; Solcá et al., 2014; Da Silveira et al., 2018; Bento et al., 2023). This residual heterogeneity highlights the need for methodological standardization in future molecular diagnostic research for visceral leishmaniasis (Rihs et al., 2025).

Similarly, the 77.3% accuracy rate in this meta-analysis resulted from a heterogeneous mix of studies with different balances between sensitivity and specificity. An accuracy of 77.3% indicates moderate performance for asymptomatic dogs but should not be used as the sole metric for clinical decisions. Therefore, the diagnosis of *L. infantum* in asymptomatic dogs requires a multifactorial approach combining PCR with serological tests (Vulpiani et al., 2011).

This meta-analysis did not show a statistical difference in sensitivity and specificity between sample types ($p > 0.05$), contrary to the expectation that less invasive samples such as conjunctival swabs would perform poorly. This finding is relevant because recent studies propose alternatives to invasive sampling. Bento et al. (2023) report higher sensitivity in conjunctival swabs compared to other matrices, and Geisweid et al. (2013) found sensitivity of 78.4% and specificity of 93.8% for this sample, which is considered a promising alternative.

Additionally, Ferreira et al. (2012) demonstrated that PCR from conjunctival swabs has sensitivity comparable to bone marrow. Subsequently, Ferreira et al. (2013) pointed out that positive results in this type of sample, for example, do not depend on the animal's clinical condition.

The conflicting results in the literature reflect variations in parasite load between tissues, which depend on the stage of parasite spread, local prevalence, and geographical context. For example, Almeida et al. (2013) found similar PCR performance between asymptomatic and symptomatic dogs overall, but higher positivity rates specifically in the leukocyte layer. Geisweid et al. (2013) reported asymptomatic dogs that were positive in conjunctival swabs but negative in bone marrow, indicating the presence of infection that was not detected using traditional lymphoid tissues. In contrast, Manna et al. (2013) found superior sensitivity and specificity in bone marrow and popliteal lymph nodes for the diagnosis of dogs without clinical signs. Therefore, as there is no proven superiority of invasive samples, considering the results of the present analysis, it is recommended to prioritize those that are less invasive and easy to collect, such as conjunctival swabs, facilitating the implementation of protocols.

Similarly, there was no statistically significant difference between primer types for sensitivity and specificity. Mitochondrial kDNA is often used because it contains multiple copies per parasite, which increases PCR sensitivity. However, this region does not confer specificity for *L. infantum*, allowing only discrimination at the genus or subgenus level (Koltas

et al., 2016). In addition, authors have observed cross-reactivity between species, probably due to the conservation of minicircle classes in each of them (Cecarelli et al., 2017; Galluzzi et al., 2018).

Therefore, it is important to investigate more specific primers, targeting nuclear regions or species-specific genes, which could increase the reliability and diagnostic applicability of the technique (Trigo et al., 2021; De Cassia-Pires et al., 2017). The specific identification of the etiological agent is very important in areas where several species of *Leishmania* are present (Fernandes et al., 2019).

In contrast, Castelli et al. (2021) state that due to the possibility of this protozoan's DNA undergoing small variations depending on the geographical region in which it is found, or lineage, the same molecular test may work correctly in one area and fail in another if the primers used do not properly recognize these genetic variations present in that population. This study also argues that in regions where several species circulate together, it is more appropriate to use more conserved targets, since amplifying only a specific sequence of a species may result in false negative or positive results. This occurs because species can be confused if the target sequences are similar. Thus, the choice of primers should consider not only the specificity of the species of interest, such as *L. infantum*, but also regional genetic diversity and the possibility of existence of other close species at the same geographical area.

The methodological weaknesses pointed out emphasize that future research on diagnostic accuracy in asymptomatic dogs needs to be more rigorous (Martinez et al., 2025). Representative and properly calculated sample sizes are essential to avoid inaccuracies in sensitivity and specificity estimates (Akoglu et al., 2022). Equally important is compliance with STARD guidelines (Bossuyt et al., 2015), which ensure methodological transparency in studies (Cohen et al., 2016; Whiting et al., 2011; Prager et al., 2020). Finally, randomization of individuals before applying reference tests and index tests is recommended to avoid bias and artificial inflation of accuracy measures (Lijmer et al., 1999; Chaturvedi et al., 2024).

In addition, future studies should seek more objective criteria for classifying asymptomatic dogs, reducing dependence on subjective clinical scores and strengthening the internal validity of the analyses (Hide et al., 2024; Solano-Gallego et al., 2011). The incorporation of these measures will contribute to the production of more robust, comparable, and applicable evidence to the real scenario of canine visceral leishmaniasis.

5. CONCLUSIONS

The synthesis of the evaluated studies demonstrates that PCR has sensitive performance for the detection of *L. infantum* in asymptomatic dogs, especially in quantitative modality. Sensitivity was consistent among different types of PCR, clinical samples, and amplification target regions, suggesting that this parameter is less dependent on methodological variations present in the literature. In contrast, specificity was clearly superior in non-quantitative PCR, a behavior that remained independent of the biological matrix or primer used. The average accuracy, close to 77% and accompanied by wide variability, reflects a still heterogeneous body of evidence, in which PCR demonstrates usefulness but it needs proper standardization.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Abdulaheem, Y., 2024. Statistical significance versus clinical relevance: key considerations in interpretation of medical research data. *Indian Journal of Community Medicine* 49, 791–795. https://doi.org/10.4103/ijcm.ijcm_601_23
- Abdulaheem, Y., 2023. Statistics in medical research: common mistakes. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 18, 1197. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2023.04.004>
- Akoglu, H., 2022. User's guide to sample size estimation in diagnostic accuracy studies. *Turkish Journal of Emergency Medicine* 22, 177–185. <https://doi.org/10.4103/2452-2473.357348>
- Alberg, A.J., Park, J.W., Hager, B.W., Brock, M.V., Diener-West, M., 2004. The use of overall accuracy to evaluate the validity of screening or diagnostic tests. *Journal of General Internal Medicine* 19, 460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1497.2004.30091.x>
- Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Madeira, M.F., 2013. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76, 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>
- Baneth, G., Solano-Gallego, L., 2022. Leishmaniosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 52, 1359–1375. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>
- Bento, M.F., Silva, M.A., Araújo, A.C., 2023. Sensitivity of PCR in conjunctival swab samples for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 32, e009423. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023063>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bossuyt, P.M., Reitsma, J.B., Bruns, D.E., 2015. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 351, h5527. <https://doi.org/10.1136/bmj.h5527>

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Campos, M.P., Figueiredo, F.B., Madeira, M.F., 2017. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues from dogs with visceral leishmaniasis. *Arquivos do Instituto Biológico* 70, 1121–1127. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-6484>

Cardoso, L., Schallig, H.D.F.H., Neto, A.L., 2021. New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. *Pathogens* 10, 307. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030307>

Castelli, G., Bruno, F., Reale, S., 2021. Molecular diagnosis of leishmaniasis: quantification of parasite load by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Pathogens* 10, 865. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070865>

Chaturvedi, M., Köster, D., Bossuyt, P.M., 2024. A unified framework for diagnostic test development and evaluation during outbreaks of emerging infections. *Communications Medicine* 4, 263. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00691-9>

Cohen, J.F., Korevaar, D.A., Gatsonis, C.A., 2016. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open* 6, e012799. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012799>

Cumpston, M., Flemyng, E., 2024. Updating a review. In: Higgins, J.P., Thomas, J., Chandler, J. (Eds.), *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, version 6.5. Cochrane Collaboration.

Cunha, R.C., Leite, R.S., Braga, D.M., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23, 269–273. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014049>

da Silveira, A.P.S., Cembranel, R., Silveira, T.C., 2018. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in an endemic area of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 51, 843. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0040-2018>

de Cássia-Pires, R., da Silva, M.A., de Oliveira, A.G., 2017. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. *PLoS One* 12, e0173922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922>

Dhom-Lemos, L., Lage, D.P., Dias, D.S., 2019. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): a novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS One* 14, e0211719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211719>

Duncan, N.R., Jara, M., Boelaert, M., 2025. From skin to sequence: pan-species detection and speciation of *Leishmania*. *Journal of Infectious Diseases* 232, 125–135. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaf345>

- Faria, A.R., Andrade, H.M., 2012. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: major technological advances and low practical application. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 3, 47–57. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>
- Fernandes, F., Ferreira, S.A., Bassetto, C.C., 2019. Comparison of PCR protocols for the detection of *Leishmania infantum* DNA in canine samples. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 18, 100318. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100318>
- Fernandes, M.A., Valadas, S.Y., Macedo, A., 2019. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 28, 194–202. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019015>
- Ferreira, S.A., Almeida, A.B.P.F., Madeira, M.F., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2150. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002150>
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 137, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.011>
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 11, 273. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
- Garner, P., Hopewell, S., Chandler, J., 2016. When and how to update systematic reviews: consensus and checklist. *BMJ* 354, i3507.
- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2013. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Veterinary Journal* 198, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.025>
- Grembi, J.A., Mayer, L.W., Drews, S.J., 2020. High-throughput multiparallel enteropathogen detection via nanoliter qPCR. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 351. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00351>
- Hide, M., Marion, E., Pomares, C., 2024. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in dogs and dog owners in an endemic area in southeast France. *Parasite* 31, 16. <https://doi.org/10.1051/parasite/2024019>
- Hossain, F., Ghosh, P., Khan, M.A., 2017. Real-time PCR in the detection and quantification of *Leishmania donovani* for diagnosis and treatment monitoring. *PLoS One* 12, e0185606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185606>
- Koltás, I.S., Eroğlu, F., Uzun, S., 2016. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of Old World leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 164, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.007>
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1998. New World leishmaniasis. In: Cox, F.E.G., Kreier, J.P., Wakelin, D. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., Vol. 5. Arnold, London, pp. 242–266.

- Laurenti, M.D., Rossi, C.N., Matta, V.L., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary Parasitology* 195, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>
- Leeftang, M.M., Deeks, J.J., Gatsonis, C., Bossuyt, P.M., Cochrane Diagnostic Test Accuracy Working Group, 2008. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Annals of Internal Medicine* 149, 889–897. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-12-200812160-00008>
- Lenth, R., 2023. *emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. R package version 1.8.5. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lijmer, J.G., Mol, B.W., Heisterkamp, S., 1999. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 282, 1061–1066. <https://doi.org/10.1001/jama.282.11.1061>
- Lin, L., 2018. Bias caused by sampling error in meta-analysis with small sample sizes. *PLoS One* 13, e0204056. 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204056>
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Gravino, A.E., 2013. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 197, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.018>
- Mano, C., Pumidonming, W., Sukphoklang, S., 2025. A one-step multiplex qPCR assay for simultaneous identification and quantification of *Leishmania martiniquensis* and *Leishmania orientalis* and detection of trypanosomatids in clinical samples. *Parasite* 32, 37. <https://doi.org/10.1051/parasite/2025030>
- Marcelino, A.P., Vieira, R.F.C., Medeiros, Z.M., 2020. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Acta Tropica* 207, 105495. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105495>
- Martinez, E.C., Navarro, M., Ruiz, J., 2025. A comprehensive guide to conduct a systematic review and meta-analysis in medical research. *Medicine* 104, e41868. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000041868>
- McInnes, M.D.F., Moher, D., Thombs, B.D., 2018. Risk of bias in systematic reviews of diagnostic accuracy studies: a comparison of QUADAS and QUADAS-2. *Systematic Reviews* 7, 26.
- Mesa, L.E., Pineda, J.A., Vélez, I.D., 2020. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis: systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14, e0007981. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007981>
- Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Martín-Sánchez, J., 2022. Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Sciences* 9, 387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>
- Narciso, T.P., Peconick, A.P., Wouters, A.T.B., Milagres, T.F., Fujiwara, R.T., Figueiredo, L.A., Viana, A.G., Alvarenga, I.M., Carvalho, R.C., Barçante, T.A., Cherem, J., Barçante,

J.M.P., 2023. Leishmaniose visceral canina: um problema de saúde pública em expansão. *Brazilian Journal of Health Review* 6, 3699–3711. <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n1-286>

Paiva-Cavalcanti, M., Régis-da-Silva, C.G., Gomes, Y.M., 2010. 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* 16, 537–542. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000400004>

Pereira, M.G., Galvão, T.F., 2014. Heterogeneity and publication bias in systematic reviews. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 23, 775–778.

Pereira, V.F., Benvenga, G.U., Toma, H.K., 2016. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49, 104–106. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0191-2015>

Petersen, C.A., Barr, S.C., 2009. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 39, 1065–1074. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.008>

Podaliri Vulpiani, M., Iannetti, L., Paganico, D., 2011. Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: state of the art. *Veterinary Medicine International* 2011, 215964.

Prager, R., O'Reilly, G., Gill, E., 2020. Adherence to the standards for reporting of diagnostic accuracy (STARD) 2015 guidelines in acute point-of-care ultrasound research. *JAMA Network Open* 3, e203871.

R Core Team, 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>

Ranganathan, P., Pramesh, C.S., Buyse, M., 2015. Common pitfalls in statistical analysis: clinical versus statistical significance. *Perspectives in Clinical Research* 6, 169–170. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.159943>

Reitsma, J.B., Glas, A.S., Rutjes, A.W.S., 2005. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *Journal of Clinical Epidemiology* 58, 982–990. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2005.02.022>

Rihs, J.B., Souza, A.A., Silva, L.A., 2025. Exploring real-time PCR techniques for diagnosing leishmaniasis: key insights from a systematic review. *Parasitology Research* 124, 54. <https://doi.org/10.1007/s00436-025-08503-2>

Salameh JP, Bossuyt PM, McGrath TA, Scholten RJPM, Naik G, van Es N et al., 2020. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies (PRISMA-DTA): explanation, elaboration, and checklist. *BMJ* 370, m2632. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2632>

Scorza, B.M., Williams, C.B., Kaneshiro, K.N., 2021. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15, e0009366. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009366>

- Segura, G.B.R., Ponce, C., Aguilar, C.M., 2023. Can domestic dogs be considered a good reservoir of *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of nonulcerated cutaneous leishmaniasis in southern Honduras? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 65, e24. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202365024>
- Sidstedt, M., Rådström, P., Hedman, J., 2020. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412, 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Shaw, S.E., Langton, D.A., Hillman, T.J., 2009. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Veterinary Parasitology* 163, 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.025>
- Siqueira, W.F., Santos, C.S., Silva, A.S., 2023. Serodiagnosis of leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic dogs by use of the recombinant dynamin-1-like protein from *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 239, 106827. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106827>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., 2011. LeishVet guidelines for practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Solcà, M.S., Guedes, C.E., Veras, P.S., 2014. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 9, e103635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103635>
- Sousa, M.R., Ribeiro, A.L.P., 2009. Systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic studies: a tutorial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 92, 241–251. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2009000300013>
- Trigo, B.B., Barbosa, L.A., Pereira, J.A., 2021. In silico and in vitro evaluation of primers for molecular differentiation of *Leishmania* species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 30, e022020. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201078>
- Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29, 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- White, S.J., Gatsonis, C., Bossuyt, P.M., 2024. Heterogeneity in systematic reviews of medical imaging diagnostic test accuracy studies. *JAMA Network Open* 7, e240649.
- Whiting, P.F., Rutjes, A.W.S., Westwood, M.E., 2011. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Annals of Internal Medicine* 155, 529–536. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009>
- World Organisation for Animal Health (WOAH), 2023. Validation of diagnostic assays. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. WOAH, Paris.
- World Health Organization (WHO), 2025. Leishmaniasis. Available at: http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 (accessed 19 December 2025).

TERCEIRA PARTE

Desenho e validação *in silico* de iniciadores específicos para genes de *Leishmania infantum*.

RESUMO

A Reação em Cadeira de Polimerase em tempo real (qPCR) constitui uma ferramenta central para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, especialmente em cães assintomáticos, nos quais a baixa carga parasitária relativamente menor impõe desafios à detecção. Entretanto, a elevada conservação genômica e a plasticidade estrutural de *Leishmania infantum*, marcada por sentença preservada, aneuploidia em mosaico e variações no número de cópias gênicas, dificultam a obtenção de iniciadores simultaneamente sensíveis e específicos, sobretudo frente a espécies filogeneticamente próximas do complexo *L. donovani*. Este capítulo abordou as principais características genômicas nucleares e mitocondriais de *L. infantum*, discutindo suas implicações diretas no desempenho de ensaios de PCR. Foram analisados alvos moleculares candidatos promissores para o diagnóstico, incluindo os genes: (HSP60), (CPB) e (G3PD). Com base nesse referencial, iniciadores direcionados a esses alvos foram desenhados e submetidos a análises *in silico* de propriedades termodinâmicas e especificidade, utilizando ferramentas de bioinformática. Os resultados indicaram que os iniciadores selecionados apresentam parâmetros físico-químicos compatíveis com amplificação eficiente e alinhamentos preferenciais com *L. infantum*, com pareamentos imperfeitos em espécies não alvo, sugerindo baixa probabilidade de amplificação cruzada. Em conjunto, os dados reforçam a importância da seleção criteriosa de alvos genômicos e da validação computacional prévia como etapas fundamentais para o desenvolvimento de ensaios de qPCR mais robustos e confiáveis no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Genoma; Ortologia; Polimorfismo; Primers; Tripanossomatídeo.

ABSTRACT

Real-time polymerase chain reaction (qPCR) is a central tool for the molecular diagnosis of visceral leishmaniasis, particularly in asymptomatic dogs, in which the relatively low parasite burden poses significant challenges for detection. However, the high degree of genomic conservation and the structural plasticity of *Leishmania infantum*, characterized by preserved synteny, mosaic aneuploidy, and variations in gene copy number, hamper the development of primers that are simultaneously sensitive and specific, especially when dealing with phylogenetically closely related species within the *L. donovani* complex. This chapter addressed the main nuclear and mitochondrial genomic features of *L. infantum* and discussed their direct implications for PCR assay performance. Promising candidate molecular targets for diagnostic purposes were analyzed, including the HSP60, CPB, and G3PD genes. Based on this framework, primers targeting these loci were designed and subjected to *in silico* analyses of thermodynamic properties and specificity using bioinformatics tools. The results indicated that the selected primers exhibit physicochemical parameters compatible with efficient amplification and show preferential alignment with *L. infantum*, while displaying imperfect pairing with non-target species, suggesting a low probability of cross-amplification. Taken together, these findings reinforce the importance of careful genomic target selection and prior computational validation as essential steps in the development of more robust and reliable qPCR assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Genome; Orthology; Polymorphism; Primers; Trypanosomatid.

1. INTRODUÇÃO

A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), é uma das ferramentas mais sensíveis e versáteis da biologia molecular, amplamente utilizada na detecção de patógenos e na análise genética. Uma vez conhecida a sequência-alvo, o método pode ser rapidamente adaptado a diferentes organismos ou variantes, permitindo diagnósticos de alta sensibilidade em curtos intervalos de tempo, em contraste com técnicas imunológicas que dependem da produção e validação de anticorpos (Kayama et al., 2021).

No diagnóstico de agentes infecciosos, a especificidade é tão crucial quanto a sensibilidade. Um ensaio molecular deve reconhecer exclusivamente o DNA do patógeno de interesse, sem amplificar sequências de organismos filogeneticamente próximos ou do hospedeiro (Van Weezep et al., 2019). Esse equilíbrio depende principalmente do desenho adequado dos iniciadores, embora seja também influenciado por fatores como preparação do DNA molde e condições de termociclagem (Ye et al., 2012).

A principal limitação ocorre quando o alvo genético escolhido apresenta regiões altamente semelhantes entre espécies relacionadas. Nessas situações, mesmo diferenças sutis na sequência podem não ser suficientes para impedir a ligação dos iniciadores, resultando em amplificação inespecífica (Kayama et al., 2019). Isso é particularmente crítico em patógenos com elevada conservação em determinados *loci*, ou em espécies com pouca divergência genética como no caso de *Leishmania infantum* (*L. infantum*) e *Leishmania donovani*.

Diversas espécies de leishmania digenéticas são descritas como causadores de leishmaniose. No Brasil, pelo menos oito espécies já foram isoladas de humanos com a doença (Anversa et al., 2018). No entanto, existem mais de vinte espécies globalmente que são patogênicas, tanto em humanos quanto em animais (Pareyn et al., 2025). Em uma análise genômica realizada na América Latina em sequências de genoma completo de *L. infantum chagasi* de Honduras, o mesmo parasito do Brasil (América do Sul) e sequências de *L. infantum* (Europa) e *L. donovani* (Índia), foi revelada alta similaridade genômica (~99%) (Silveira et al., 2022). Essa diversidade etiológica dificulta o diagnóstico específico do parasita, pois exige métodos moleculares capazes de diferenciar espécies do continente americano com essa alta sintonia.

Diante dessa elevada similaridade, é fundamental assegurar que os iniciadores discriminem espécies geneticamente próximas. A validação adequada é determinante para garantir especificidade, sensibilidade e consistência analítica. Mesmo quando a PCR produz amplificação, isso não garante que o produto represente o alvo correto (Bustin, 2017). O desenho criterioso exige a seleção de regiões que equilibrem sensibilidade e especificidade,

especialmente em contextos diagnósticos complexos, como a leishmaniose visceral canina assintomática (Ye et al., 2012).

Diante do exposto, como parte do desdobramento metodológico da investigação sobre o diagnóstico molecular da infecção canina por *L. infantum*, este capítulo tem como objetivo descrever o desenho e a análise *in silico* de iniciadores específicos para *L. infantum*, utilizando softwares de bioinformática e plataformas genômicas, visando garantir sensibilidade e especificidade para aplicação em cães infectados sem sinais clínicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Organização Genômica de *L. infantum*

Os parasitos do gênero *Leishmania* são eucariontes, mas apresentam particularidades marcantes em sua organização genética. Seus genomas exibem elevada sintenia e um arranjo peculiar, caracterizado, entre outros aspectos, pela quase completa ausência de íntrons, uma característica típica dos tripanossomatídeos (Kawagoe et al., 2021; Kazemi et al., 2011; Peacock et al., 2007;). Essa ausência de íntrons simplifica o desenho de iniciadores, ao eliminar riscos de variantes de *splicing* e permitir o uso direto do DNA genômico como molde (Camacho et al., 2023; Kazemi et al., 2011).

A relevância médica de *Leishmania*, aliada às particularidades de seus mecanismos moleculares e à complexidade estrutural dos tripanossomatídeos, torna necessária a compreensão detalhada de sua variabilidade genética (González-de la Fuente et al., 2017). Em 1995, a Organização Mundial da Saúde (OMS) coordenou esforços para determinar sequências específicas do genoma de espécies de *Leishmania* (Gonzalez-Garcia et al., 2025). A primeira espécie a ter seu genoma sequenciado foi *L. major*, que posteriormente serviu como modelo para análises comparativas em outras espécies. As sequências do genoma de *L. infantum* foram publicadas em 2007, permitindo análises abrangentes de expressão gênica em todo o genoma (González-de la Fuente et al., 2017). Em 2017, uma montagem genômica aprimorada foi gerada utilizando tecnologias de sequenciamento de segunda e terceira geração (Camacho et al., 2023). A terceira espécie a ser sequenciada foi a *L. braziliensis* (Teixeira et al., 2012).

A cepa JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-724) foi escolhida para o sequenciamento do genoma de *L. infantum* (Peacock et al., 2007). Esse isolado foi obtido em Madri, Espanha, a partir de um cão naturalmente infectado com leishmaniose visceral. Após o isolamento, a cepa foi criopreservada no Centro Nacional de Microbiologia do Instituto de Salud Carlos III e disponibilizada para diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo (González-de la Fuente et

al., 2017). Ensaios experimentais demonstraram que essa linhagem mantém elevada virulência em infecções caninas e apresenta adequação para procedimentos de manipulação genética, mantendo o potencial infeccioso mesmo após modificações laboratoriais (Moreno et al., 2007).

Estudos de genômica comparativa demonstraram baixa divergência entre as espécies *L. major*, *L. infantum*, e *L. braziliensis*, em termos de sequência e organização genômica (Lynn, 2008; Peacock et al., 2007). Essa alta conservação e sintonia genômica demonstra que o genoma de *Leishmania* é muito estável e não sofreu grandes rearranjos genômicos durante a especiação (Teixeira et al., 2012).

2.2. Estrutura do genoma nuclear e mitocondrial e plasticidade genômica de *L. infantum*

O genoma de *L. infantum* é organizado em dois compartimentos distintos: o genoma nuclear, presente nos cromossomos, e o genoma mitocondrial, conhecido como kDNA (Peacock et al., 2007). Cada um possui características estruturais específicas que influenciam a sensibilidade e a especificidade de testes de PCR para diagnóstico (Lopes et al., 2016).

Esses resultados sustentaram sua escolha para a elaboração do primeiro rascunho genômico de uma espécie viscerotrópica de *Leishmania* (Peacock et al., 2007). O sequenciamento foi realizado por meio da estratégia *shotgun* de genoma completo com cobertura média do genoma de cinco vezes. As leituras iniciais foram organizadas em 562 *contigs*, posteriormente integrados em 36 *scaffolds* cromossômicos, tomando-se como referência o genoma de *L. major* (González-de la Fuente et al., 2017; Peacock et al., 2007; Kawagoe et al., 2021).

Cada *scaffold* corresponde a um cromossomo da espécie, totalizando 32.802.969 pb. (Kawagoe et al., 2021; González-de la Fuente et al., 2017; NCBI, 2023). A anotação funcional indica a presença de cerca de 8.700 genes codificadores de proteínas, embora refinamentos contínuos na montagem de 2017 tenham elevado esse número para 8.796 (González-de la Fuente et al., 2017).

Embora o genoma de referência seja fundamental, é importante destacar que ele não reflete toda a variabilidade presente na espécie. A análise de múltiplos isolados é necessária para compreender a diversidade genética e a evolução das populações de parasitos, identificando características compartilhadas ou exclusivas, padrões epidemiológicos e mecanismos de virulência (Carvalho et al., 2020).

Conforme documentado por Iovannisci e Beverly (1989), foi levantada a primeira hipótese de um genoma predominantemente diploide no parasito. Com o passar dos anos e

avanços tecnológicos, surgiram evidências de trissomia, fundamentando o que se conhece como aneuploidia, sendo um fenômeno característico de *Leishmania spp.* (Santos, 2025).

Nos últimos anos, *Leishmania spp.* emergiu como um modelo único para o estudo da aneuploidia e seu papel adaptativo. Esse termo, se refere a um desequilíbrio na dosagem entre cromossomos em uma célula, e que pode estar associado a efeitos deletérios ou até mesmo ser letal, particularmente em organismos multicelulares. No entanto, eucariotos unicelulares podem tolerar bem esse desequilíbrio, e ser até mesmo benéfico, como no caso do parasito em questão (Negreira et al., 2023).

Todos os genomas de *Leishmania* têm sido identificados até o momento como aneuploides (Rogers et al., 2011). Posteriormente, análises mais detalhadas revelaram que, dentro de uma mesma cultura, podem coexistir células com diferentes combinações de ploidia, fenômeno conhecido como aneuploidia em mosaico (Iourov; Vorsanova; Yurov, 2008). Nesse caso, mesmo em populações clonais, células que são geneticamente equivalentes podem exibir variações no cariótipo. Dessa forma, é possível encontrar células individuais com três ou mais cópias de um mesmo cromossomo (Negreira et al., 2019).

Essa variabilidade estrutural ocorre juntamente com outras alterações genômicas, como inserções, deleções e flutuações no número de cópias gênicas. Esses mecanismos combinados contribuem para a capacidade adaptativa do parasito, modulando sua aptidão diante das pressões evolutivas impostas por hospedeiros, por medicamentos e demais pressões ambientais (Black et al., 2023). *Leishmania* se destaca como um modelo de plasticidade genética, caracterizada por alterações rápidas e dinâmicas no número de cópias de genes e cromossomos (Santos, 2025). Apesar dos avanços no entendimento desse fenômeno, ainda há questionamentos sobre como o parasito consegue equilibrar essa instabilidade, que favorece a adaptação, com a necessidade de manter a integridade do genoma (Black et al., 2023).

Ainda não está totalmente esclarecido se esse dinamismo genético contribui diretamente para as diferentes formas clínicas e para a gravidade das leishmanioses. Evidências obtidas em modelos *in vitro* indicam que múltiplos fatores participam desse processo, incluindo vias de reparo de DNA (Laffitte et al., 2016), regiões repetitivas do genoma (Ubeda et al., 2014) e padrões de replicação atípicos que aumentam a complexidade replicativa (Damasceno et al., 2020). Esses achados reforçam que a plasticidade genômica é um fenômeno multifatorial, intimamente relacionado às particularidades estruturais do genoma de *Leishmania* e a processos ambientais (Santos, 2025).

Embora o genoma de *L. infantum* seja relativamente conservado em termos estruturais, alguns isolados das Américas apresentam uma deleção homozigótica no cromossomo 31, que

remove genes do *locus* 3'-nucleotidase/nuclease (3'NT/NU) (Florêncio, 2025). Esse mesmo cromossomo frequentemente apresenta polissomia, característica que se mantém mesmo entre isolados de diferentes regiões geográficas (Carvalho et al., 2020; Florêncio, 2025). Esses achados evidenciam a elevada plasticidade genômica do parasito. No contexto de PCR para diagnóstico, essa variação estrutural sugere que alvos localizados nessa região poderiam estar ausentes em alguns isolados, aumentando o risco teórico de resultados falso-negativos, mesmo na presença do parasito.

Essas particularidades estruturais e dinâmicas do genoma de *L. infantum* têm implicações diretas para o desenvolvimento de ensaios moleculares de diagnóstico. A variação no número de cópias gênicas entre isolados, associada a eventos de deleção ou amplificação cromossômica, pode comprometer sítios de anelamento de iniciadores e sondas, reduzindo a eficiência de amplificação mesmo na presença do parasito (Florêncio et al., 2025; Schwabl et al., 2021; Carnielli et al., 2018). Esse risco é particularmente relevante em contextos epidemiológicos complexos, nos quais diferentes genótipos podem coexistir em uma mesma população ou até em um mesmo hospedeiro, exigindo alvos capazes de reconhecer variantes genéticas distintas de forma consistente (Cupolillo et al., 2020; El Hamouchi et al., 2017; Roca-Geronès et al., 2024).

A elevada conservação genômica entre espécies de *Leishmania*, especialmente em regiões nucleares e mitocondriais, representa outro fator limitante para a obtenção de iniciadores altamente específicos. Diversos alvos moleculares apresentam sequências conservadas entre espécies simpátricas, favorecendo amplificações cruzadas e dificultando a discriminação interespecífica. Esse fenômeno foi observado em ensaios amplamente utilizados, como aqueles baseados nos iniciadores RV1/RV2 e LEISH1/LEISH2, que podem amplificar DNA de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, além de *L. infantum*, comprometendo a acurácia diagnóstica em áreas endêmicas (Bento et al., 2024; Conter et al., 2019; Araújo et al., 2023).

No caso específico do genoma mitocondrial, embora o elevado número de cópias dos minicírculos de kDNA aumente a sensibilidade analítica, a heterogeneidade dessas sequências entre isolados e genótipos pode limitar a universalidade dos iniciadores. Polimorfismos mesmo em regiões consideradas conservadas podem reduzir a eficiência de amplificação ou dificultar a discriminação entre espécies do complexo *L. donovani*, como *L. infantum* e *L. donovani*, que apresentam alta similaridade genômica em função de uma divergência evolutiva relativamente recente (Lukes et al., 2007; El Baldouri et al., 2013; Franssen et al., 2020; Roca-Geronès et al., 2024).

Dessa forma, a escolha de alvos moleculares para PCR e qPCR em *L. infantum* deve considerar não apenas a sensibilidade analítica, mas também a estabilidade estrutural do locus, a variabilidade genética intraespecífica e o contexto epidemiológico em que o ensaio será aplicado. Esses fatores reforçam a necessidade de estratégias diagnósticas que combinem alvos multicópias e genes nucleares mais estáveis, visando maior especificidade, reprodutibilidade e robustez em diferentes cenários epidemiológicos.

Para reduzir falhas, a escolha do alvo deve priorizar regiões genômicas estáveis e genes multicópias que tendem a preservar tanto sua presença quanto sua sequência ao longo das populações. Essa estratégia aumenta a sensibilidade e diminui falhas analíticas. Em resumo, as evidências indicam que a variação no número de cópias gênicas em *L. infantum* não é apenas um fenômeno biológico isolado, mas um fator crítico a ser considerado na seleção de alvos moleculares robustos (Martin-Carreras et al., 2022).

Apesar da variabilidade estrutural do genoma, a organização geral dos cromossomos e a ordem dos genes (sintenia) são altamente conservadas entre diferentes cepas e até mesmo entre espécies em diferentes regiões geográficas como *L. major* e *L. donovani* (Wincker et al., 1996; Ravel et al., 1999; Rogers et al., 2011). Essa conservação é essencial para a viabilidade do parasita, mesmo diante de eventos de amplificação, deleção ou recombinação, que não comprometem genes e regiões cromossômicas críticas à sobrevivência (Rogers et al., 2011; Peacock et al., 2007). Mapeamentos genômicos detalhados mostraram que a estrutura fina de cromossomos, como o cromossomo 5, é praticamente idêntica entre *L. infantum* e *L. major*, enquanto análises de isolados de diferentes regiões revelam variação populacional significativa (Teixeira et al., 2017; Patino et al., 2021; Bussotti et al., 2020). Essa estabilidade estrutural, combinada com a flexibilidade proporcionada pela aneuploidia, permite que *L. infantum* mantenha funções essenciais e sua capacidade adaptativa.

A conservação estrutural do genoma nuclear, mesmo diante de eventos de amplificação, deleção e recombinação, assegura a manutenção de genes e regiões críticas para a viabilidade do parasito (Rogers et al., 2011; Peacock et al., 2007). Entre esses, genes essenciais localizam-se frequentemente em cromossomos mais estáveis e participam de funções vitais, como metabolismo, replicação, resposta ao estresse e virulência, de modo que sua deleção pode ser letal (Rogers et al., 2011; Romão, 2009).

O genoma mitocondrial de *L. infantum*, denominado DNA do cinetoplasto (kDNA), encontra-se na mitocôndria única do parasita e corresponde a uma fração significativa do DNA total da célula, podendo representar entre 20 e 25% do conteúdo genético celular (Camacho et al., 2019; Kocher, 2018).

O kDNA apresenta uma organização complexa, composta por moléculas circulares de DNA dispostas em dois tipos principais: maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos, presentes em número de 20 a 50 por célula, possuem tamanho entre 20 e 40 kb e são funcionalmente equivalentes ao genoma mitocondrial de outros eucariotos, codificando RNAs ribossômicos e proteínas essenciais para a cadeia respiratória mitocondrial (Camacho et al., 2019; Solana et al., 2022).

Já os minicírculos, presentes em milhares de cópias por célula, variam de 0,5 a 2 kb e são responsáveis por codificar RNAs-guia necessários para o processo de edição de RNA dos transcritos dos maxicírculos (Kocher, 2018; Camacho et al., 2019). Apesar da heterogeneidade das sequências dos minicírculos, a estrutura geral do kDNA e a sequência dos maxicírculos são altamente conservadas entre diferentes cepas e espécies de *Leishmania*, tornando o maxicírculo um marcador robusto para estudos filogenéticos e de tipagem molecular (Bussotti et al., 2020; Kocher et al., 2018; Solana et al., 2022). Embora haja variação na composição dos minicírculos entre isolados de diferentes regiões geográficas ou de hospedeiros, a conservação dos maxicírculos permite discriminar populações e clados de *L. infantum*, inclusive identificando assinaturas específicas para diferentes regiões. Além disso, o elevado número de cópias dos minicírculos os torna alvos promissores para métodos moleculares de diagnóstico, como PCR e qPCR, especialmente em amostras com baixa carga parasitária (Cecarelli et al., 2017; Mary, 2004).

Considerando a complexidade e diversidade de classes de minicírculos, o anelamento de iniciadores ou sondas nem sempre é universal, exigindo validação cuidadosa de cada conjunto para assegurar especificidade e sensibilidade (Cecarelli et al., 2017; Kocher et al., 2018; Camacho et al., 2019; Cecarelli et al., 2019). Portanto, muitos ensaios de PCR ou qPCR projetados para uma única espécie podem amplificar mais de uma espécie de *Leishmania*, exigindo atenção ao contexto diagnóstico (Losada-Barragán, 2016; Cecarelli, 2014). O kDNA de *L. infantum*, com sua organização e conservação, reflete sua importância funcional e evolutiva, sendo um alvo importante para detecção molecular e estudos filogenéticos.

A escolha do alvo genético para PCR em *Leishmania infantum* deve considerar o contexto diagnóstico e epidemiológico específico, sobretudo em áreas onde múltiplas espécies coexistem, o que torna a diferenciação crucial para o tratamento correto dos casos confirmados (Goto, 2010; Cecarelli et al., 2017).

Entre os principais alvos utilizados estão genes multicópia, como o kDNA que proporcionam maior sensibilidade para detecção em amostras com baixa carga parasitária, assim como o gene CPB (cisteína protease B) (Chaouch et al. 2013). Quanto a genes de cópia

simples, como HSP60 (proteína de choque térmico 60) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), podem oferecer maior especificidade para identificação de espécies (Rey-Ladino et al., 1997; De Cassia-Pires et al., 2017; Anand et al., 2024; Morales-Yuste, 2022; Prasanna & Upadhyay, 2021; Olías-Molero et al., 2019).

A escolha do alvo molecular deve levar em conta o objetivo do diagnóstico, e a necessidade de distinguir entre diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, é essencial considerar as vantagens e limitações de cada abordagem e adotar padronização metodológica, garantindo resultados confiáveis, replicáveis e comparáveis entre estudos (Morales-Yuste, 2022; Moreira et al., 2018; Pennisi et al., 2015). Essa reflexão sobre critérios de seleção de alvos serve como ponte para a análise detalhada dos principais genes candidatos para detecção de *L. infantum*, tema que será abordado a seguir

2.3. Alvo candidato número 1: proteína de choque térmico 60 (HSP60)

As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas ubíquas expressas na maior parte dos tipos celulares e importantes para evitar o dobramento incorreto e agregação de proteínas. São amplas opções em subgrupos: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, proteínas de choque térmico pequenas (sHSP), etc., baseadas em seus pesos moleculares, funções, arranjos estruturais e localização subcelular (Prasanna & Upadhyay, 2021).

HSP60, uma proteína de aproximadamente 60 kDa, também conhecida como GroEL em bactérias, constitui uma classe de moléculas associadas que formam complexos em anel com cavidades internas onde acomodam polipeptídeos desdobrados. Este ambiente isolado permite o dobramento correto das proteínas, protegido do meio celular, em um processo dependente de ATP e assistido por moléculas acessórias HSP10 (GroES em bactérias) que funcionam como “tampas” nas estruturas de dobramento ativo (Stevens et al., 2019).

Em *Leishmania*, HSP60/CPN60 é essencial, com funções críticas na classificação parasitária, resposta ao estresse ambiental e tráfego proteico mitocondrial (Prasanna & Upadhyay, 2021). Em *L. donovani*, a expressão de CPN10 aumenta durante a transformação em amastigotas e em resposta ao estresse, sustentando as funções do complexo HSP60/CPN60 (Colineau et al., 2017). Considerando a proximidade filogenética, presume-se que HSP60 desempenhe funções equivalentes em *L. infantum*, reforçando seu papel não redundante.

O gene HSP60 de *L. major* foi clonado, sequenciado e expresso em *E. coli*, revelando um quadro de leitura aberto de 1770 pares de bases, codificando um polipeptídeo de 589 aminoácidos, com massa molecular prevista de 64,79 kDa (Rey-Ladino et al., 1997). Estudos de *Southern blot* e análise de restrição confirmaram que HSP60 é de cópia única, diferenciando-

se de HSP70, que possui múltiplas isoformas. A localização mitocondrial do HSP60 foi confirmada por fracionamento celular, evidenciando co-isolamento com mitocôndrias (Rey-Ladino et al., 1997).

Embora HSP60 tenha sido investigada como antígeno sorológico (Rey-Ladino et al., 1997) e alvo terapêutico potencial (Stevens et al., 2019), não há relatos de validação deste gene como alvo de qPCR em *L. infantum*. Entretanto, sua estrutura e conservação biológica sugerem que pode ser um candidato adequado para detecção molecular.

Estudos de imunoproteômica, combinados com análises bioinformáticas, identificaram HSP60 como um dos principais antígenos reconhecidos por soros de cães assintomáticos (Agallou et al., 2016), contendo epítomos que se ligam a múltiplas moléculas de MHC classe I e II, indicando potencial para vacinas multiespecíficas. HSP60 foi detectada precocemente por *western blot* em cães experimentalmente infectados a partir da décima semana pós-infecção, reforçando seu potencial como marcador diagnóstico (Olias-Molero et al., 2019).

Sua expressão em diferentes fases do ciclo parasitário sugere utilidade também em infecções subclínicas, com carga parasitária reduzida. Apesar de HSP70 e outras HSPs poderem apresentar reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, HSP60 mostrou reatividade específica com soros de cães infectados por *L. infantum*, incluindo casos subclínicos, o que confere maior especificidade diagnóstica (Olias-Molero et al., 2019).

2.4. Alvo candidato número 2: cisteína peptidase B (CPB)

O CPB refere-se ao gene que codifica a cisteína protease B, uma enzima do tipo catépsina L presente em múltiplas cópias no genoma de parasitas do gênero *Leishmania*. Esta protease desempenha papéis essenciais na biologia do parasito, incluindo processos de diferenciação, virulência, evasão do sistema imune do hospedeiro e adaptação a diferentes ambientes (Hide et al., 2006). O gene CPB apresenta variações entre espécies do complexo *L. donovani*, sendo que a variante *cpbE* é característica de *L. infantum*, enquanto *cpbF* é típica de *L. donovani*, permitindo sua diferenciação molecular (Hide et al., 2006; Benikhlef, 2023).

Para fins diagnósticos, o valor do gene *cpb* está na sua variabilidade genética. Embora conservado dentro do complexo *L. donovani*, o gene apresenta alelos específicos que refletem a variação evolutiva entre espécies próximas (Hide et al., 2006; Benikhlef, 2023). A variabilidade do gene *cpb* no complexo *L. donovani* foi explorada por Hide et al. (2006), que mostraram que cópias específicas, como *cpbE* em *L. infantum* e *cpbF* em *L. donovani*, permitem a discriminação molecular entre essas espécies por PCR convencional. Esses achados

indicam que o cpb é um alvo promissor para o desenho de iniciadores específicos, que neste trabalho serão direcionados para aplicação em qPCR na detecção de *L. infantum*.

Essa capacidade de discriminação pode ter relevância clínica significativa. Em regiões onde múltiplas espécies de *Leishmania* (viscerotrópicas ou dermatrópicas) circulam simultaneamente, identificar precisamente a espécie infecciosa é fundamental para decisões terapêuticas.

2.5. Alvo candidato número 3: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD)

O gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH ou G3PD) é um gene constitutivo amplamente conservado, responsável pela codificação de uma enzima essencial do metabolismo glicolítico. Nos estudos de diagnóstico molecular da leishmaniose, o G3PD tem sido historicamente empregado não como alvo direto para detecção do DNA de *L. infantum*, mas como controle interno de qualidade das amostras. Nesse contexto, sua amplificação assegura que o DNA extraído de tecidos de mamíferos apresenta integridade adequada e está apto à amplificação, reduzindo a ocorrência de resultados falso-negativos associados a falhas no processo de extração ou à presença de inibidores da reação de PCR (Trajano et al., 2017; Rampazzo et al., 2017; De Cássia-Pires, 2017; Gonçalves et al., 2012).

Apesar desse uso consolidado como controle endógeno, o G3PD do próprio parasito apresenta características que sustentam sua proposta como alvo específico em ensaios de qPCR, especialmente no contexto de infecções caninas assintomáticas. Estudos conduzidos por Trajano-Silva et al. (2017) e Gonçalves et al. (2012) demonstraram, na prática, que o locus G3PD é particularmente adequado ao desenho de oligonucleotídeos e à amplificação reprodutível em diferentes plataformas diagnósticas, incluindo PCR convencional, multiplex e qPCR. Esses achados constituem um precedente metodológico robusto para a proposição do G3PD de *L. infantum* como alvo molecular em protocolos de qPCR aplicados à leishmaniose canina.

Do ponto de vista funcional, o G3PD é responsável pela conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, etapa central da via glicolítica (Zhang et al., 2021). Em organismos eucariotos, genes associados a essa via metabólica são classicamente descritos como essenciais à sobrevivência celular, o que reduz a probabilidade de eventos de deleção ou pseudogenização ao longo da evolução (Hassan et al., 2025; Rodico, 2022). Além disso, esses genes apresentam expressão constitutiva em diferentes estágios de desenvolvimento e sob variadas condições fisiológicas (Tatton et al., 2000). Esse perfil funcional é semelhante ao observado em outros genes metabólicos nucleares, como *G6PD* e *MPI*, já empregados como

alvos de qPCR em *Leishmania* justamente por sua estabilidade, essencialidade e natureza codificadora (Trajano-Silva et al., 2017).

Adicionalmente, por se tratar de um gene nuclear e, presumivelmente, de cópia única ou em baixo número de cópias, o G3PD de *L. infantum* mostra-se particularmente adequado para fins de quantificação da carga parasitária. Nessa condição, o número de cópias amplificadas tende a refletir de forma mais direta o número de parasitos presentes na amostra, em contraste com alvos multicópias, como o kDNA, que apresentam elevada variabilidade estrutural e numérica entre cepas e isolados (Castanheira et al., 2025; De Luna et al., 2025).

Corroborando essa viabilidade, estudos envolvendo ensaios multiplex e duplex PCR com o G3PD de mamíferos demonstraram ser possível o desenho de iniciadores e sondas sem similaridade significativa com sequências de *L. infantum*, *L. braziliensis* ou *Trypanosoma cruzi*, garantindo ausência de amplificação cruzada (Trajano-Silva et al., 2017; Gonçalves et al., 2012). Paralelamente, análises de alinhamento de sequências permitiram identificar regiões suficientemente conservadas para amplificação em múltiplas espécies de mamíferos, sem comprometimento da especificidade (Gonçalves et al., 2012). Esses dados indicam que, embora o G3PD seja altamente conservado dentro de cada espécie, diferenças de sequência entre grandes grupos taxonômicos, como mamíferos e tripanossomatídeos, são suficientes para impedir reações cruzadas indesejadas.

Dessa forma, considerando as limitações reconhecidas dos alvos clássicos empregados no diagnóstico molecular da leishmaniose canina, notadamente o potencial de reações cruzadas e a elevada variabilidade dos minicúlos de kDNA, bem como a tendência recente de combinar alvos multicópias com genes nucleares em protocolos multiplex ou duplex, o desenvolvimento de um ensaio de qPCR direcionado ao G3PD de *L. infantum* em cães se justifica como uma estratégia promissora. Tal abordagem tem potencial para aumentar a especificidade, a reprodutibilidade e a capacidade de quantificação da carga parasitária em diferentes matrizes biológicas, incluindo animais assintomáticos em áreas endêmicas (Castanheira et al., 2025; De Luna et al., 2025; Trajano-Silva et al., 2017; Gonçalves et al., 2012).

2.6 Importância das ferramentas de bioinformática

A qualidade dos iniciadores é determinante para o sucesso dos protocolos de PCR, influenciando diretamente a especificidade e a sensibilidade da amplificação (Untergasser, 2012; Ye et al., 2012; Abd-Elsalam, 2003). Antes do desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas, o desenho de iniciadores era realizado manualmente, tarefa tediosa, propensa a erros e extremamente demorada (Pitsch et al., 2025; Chukwuemeka et al., 2020). Nas últimas

duas décadas, programas sofisticados tornaram possível gerar iniciadores com rapidez e precisão, apoiados em critérios computacionais específicos (Ye et al., 2012; Pitsch et al., 2025; Koyun, 2024; Kalendar et al., 2017).

O desempenho de uma PCR depende da qualidade dos iniciadores selecionados (Bustin et al., 2017; Ye et al., 2012). Iniciadores eficientes apresentam temperaturas de fusão (T_m) compatíveis, proporção equilibrada de G e C e ausência de estruturas secundárias indesejáveis, como grampos ou dímeros. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem impedir o anelamento adequado do iniciador, o que torna importante evitar regiões altamente polimórficas na sequência-alvo (Ye et al., 2012; Untergasser et al., 2012).

Diversos programas gratuitos auxiliam nesse trabalho. O Primer3 é amplamente utilizado para gerar automaticamente candidatos a iniciadores conforme parâmetros pré-estabelecidos, mas não realiza análise de especificidade, o que exige complementação com outras ferramentas (Rozen et al., 2000). A integração com BLAST, como no Primer-BLAST, permite verificar se os iniciadores amplificam apenas as sequências desejadas, prevenindo reações cruzadas com diversos genomas, antes da experimentação laboratorial (Ye et al., 2012; Losada-Barragán et al., 2016; Wu et al., 2022; Hide et al., 2006).

A validação computacional examina propriedades termodinâmicas e risco de estruturas secundárias (grampos de cabelo, dímeros) usando ferramentas como OligoAnalyzer (Owczarzy et al., 2008; Chavali et al., 2005). A combinação de bioinformática e experimentação acelera cronogramas de desenvolvimento, reduzindo significativamente falhas posteriores (Samsami et al., 2023; Chicharro et al., 2023; Araújo et al., 2023; Bento et al., 2024).

Após a aplicação do Primer-BLAST para assegurar a especificidade dos iniciadores e do OligoAnalyzer para a avaliação das propriedades termodinâmicas e do risco de formação de estruturas secundárias, o FastPCR destaca-se como uma ferramenta bioinformática integrada para a análise *in silico* de reações de PCR. Essa plataforma possibilita a simulação virtual de PCR em sequências lineares ou circulares, realizando buscas em bancos de dados para identificação de amplicons potenciais, bem como a avaliação da sensibilidade e da especificidade dos iniciadores. Adicionalmente, o FastPCR permite a detecção de dímeros e estruturas secundárias que podem comprometer a eficiência da amplificação, ampliando o controle sobre fatores críticos do ensaio (Kalendar et al., 2017; Kalendar et al., 2017).

O FastPCR suporta diferentes modalidades de PCR, incluindo PCR multiplex, em tempo real e de longa distância, além de disponibilizar recursos para análise em lote, fundamentais em estudos que demandam automação e processamento de grandes volumes de dados (Kalendar et al., 2021; Kalendar, 2013). Essa versatilidade o torna uma ferramenta estratégica no

planejamento experimental, contribuindo para a otimização do desenho de iniciadores e sondas com elevada especificidade e eficiência. Dessa forma, o FastPCR não apenas complementa, mas também potencializa as análises realizadas pelo Primer-BLAST e pelo OligoAnalyzer, consolidando-se como um recurso essencial para o desenvolvimento de protocolos de PCR *in silico* robustos e confiáveis (Kalendar et al., 2022; Kalendar, 2013; Kalendar et al., 2009).

Antes da consolidação dessas ferramentas, a verificação da especificidade dos iniciadores dependia de procedimentos manuais extensivos, como alinhamentos de sequências, análises visuais de possíveis amplificações cruzadas e redesenho iterativo dos iniciadores, processos suscetíveis a erros humanos e inviáveis em estudos de maior escala (O'Halloran, 2016; Arányi et al., 2006). A bioinformática, portanto, transformou a forma de desenvolver iniciadores, ao permitir análises sistemáticas, reprodutíveis e integradas, aumentando substancialmente a eficiência e a confiabilidade dos ensaios de diagnóstico molecular.

2.7 Aplicações práticas e perspectivas futuras

O diagnóstico da leishmaniose visceral enfrenta um desafio central: a ausência de padronização metodológica. Diferentes grupos de pesquisa desenvolveram protocolos de qPCR, cada qual utilizando iniciadores, alguns marcados com sondas (TaqMan ou SYBR Green), condições de ciclagem e estratégias de quantificação próprias. Essa diversidade resulta em um cenário fragmentado, no qual um mesmo paciente pode receber resultados distintos dependendo do laboratório responsável pelo exame (Galuzzi et al., 2018; Lordêlo et al., 2025; Trajano et al., 2017).

A qPCR apresenta vantagens operacionais importantes em relação à PCR convencional, que justificam seu amplo uso em diagnóstico e monitoramento. Por permitir o acompanhamento da fluorescência a cada ciclo, a qPCR produz dados quantitativos em tempo real, eliminando a necessidade de etapas pós-amplificação como eletroforese em gel e reduzindo o tempo total de obtenção de resultados para cerca de 2–3 horas (Arya et al., 2005).

O uso de sistemas de tubo fechado, sem abertura dos recipientes após a reação, diminui de forma significativa o risco de contaminação por produtos de PCR e, consequentemente, a ocorrência de falsos positivos, além de reduzir o manuseio e a variabilidade associada ao operador (Kralik, 2017; Heid et al., 1996). A técnica é também altamente escalável, uma vez que plataformas modernas permitem analisar simultaneamente dezenas a centenas de amostras, com ampla faixa dinâmica de quantificação (tipicamente 5–9 ordens de grandeza) e alta sensibilidade (McNair et al., 2025; Ward, 2024; Watzinger, 2006; Heid, 1996).

Por fim, a qPCR integra-se facilmente a fluxos de trabalho automatizados, que incluem extração, preparo da reação e análise dos dados, possibilitando alto rendimento, menor necessidade de intervenção especializada, redução de erros humanos e maior reprodutibilidade dos ensaios em ambientes clínicos e industriais (Zou et al., 2025; MacLean, 2024; Kreitmann et al., 2023; Arya et al., 2005;

A heterogeneidade nos protocolos não é apenas inconveniente; possui implicações clínicas significativas. A quantificação da carga parasitária é essencial para avaliar a gravidade da doença, monitorar a resposta ao tratamento e identificar possíveis recaídas. Sem padronização, os valores obtidos por qPCR em diferentes laboratórios não são comparáveis, comprometendo a implementação de procedimentos diagnósticos confiáveis. Protocolos de qPCR padronizados surgem, portanto, como uma estratégia fundamental para reduzir essa variabilidade e estabelecer resultados reproduzíveis (Galuzzi et al., 2018; Lordêlo et al., 2025; Trajano et al., 2017).

Apesar da efetividade comprovada no diagnóstico da leishmaniose, a implementação de uma qPCR totalmente padronizada em estudos multicêntricos é reconhecidamente desafiadora, porque o desempenho do ensaio é influenciado por múltiplos fatores que variam entre laboratórios, incluindo plataforma de qPCR, mistura-reação (master mix), desenho de iniciadores/probes, curva-padrão, qualidade da amostra e condições de análise de dados (Duff et al., 2025; Taylor et al., 2019; Ruiz-Villalba et al., 2017).

Revisões e diretrizes (como MIQE e suas atualizações) ressaltam que a heterogeneidade de reagentes, equipamentos e fluxos de trabalho levou à publicação de muitos dados pouco reprodutíveis, e que apenas a adoção rigorosa de protocolos detalhados, validação extensiva e relato padronizado permite reduzir essa variabilidade e viabilizar comparações multicêntricas confiáveis (Bustin et al., 2025; Bustin, 2024; Morinha, 2020).

Essa lacuna contribui para variações metodológicas entre laboratórios dificulta a comparação de dados entre centros de pesquisa (Rihs et al., 2025; Chicharro et al., 2023; Galuzzi et al., 2018). A padronização permitiria reduzir essas inconsistências e fornecer uma base sólida para interpretação clínica dos resultados.

Estudos demonstram que a adoção de protocolos duplex qPCR padronizados, incluindo iniciadores, sondas, condições de ciclagem e concentrações de reagentes uniformes, torna os resultados obtidos por diferentes laboratórios comparáveis (Trajano-Silva et al., 2017). Essa consistência possibilita a definição de limites de carga parasitária que indicam gravidade clínica de forma confiável. A quantificação precisa da carga parasitária está associada à avaliação da

gravidade da doença e ao prognóstico do tratamento, reforçando a necessidade de protocolos padronizados para aplicação clínica (Lordêlo et al., 2025; Filgueira et al., 2020).

Mesmo com os benefícios evidentes, diversos desafios ainda limitam a implementação generalizada de métodos qPCR harmonizados. A heterogeneidade dos alvos moleculares é um dos principais obstáculos: diferentes laboratórios utilizam distintas regiões de kDNA (minicírculos ou maxicírculos), fragmentos de tamanhos variados e abordagens de quantificação diversas, como uso de genes do parasito inseridos em plasmídeos, uso de parasitos cultivados ou quantificação relativa (Rihs et al., 2025; Filgueira et al., 2020). Sem consenso sobre o alvo molecular, a comparabilidade de resultados é comprometida, dificultando o estabelecimento de diagnósticos verdadeiramente padronizados.

Perspectivas futuras para o diagnóstico de *L. infantum* envolvem iniciativas internacionais de padronização de protocolos qPCR, incluindo refinamento de métodos existentes e integração de novos alvos moleculares. O desenvolvimento de plataformas multiplex padronizadas, capazes de detectar múltiplas espécies simultaneamente, identificar a espécie em tempo real e quantificar a carga parasitária com precisão, representa um objetivo central para os próximos anos (Chicharro et al., 2023; Galuzzi et al., 2018). A padronização global permitirá resultados consistentes, comparáveis e clinicamente úteis, consolidando a qPCR como ferramenta confiável no diagnóstico e manejo da leishmaniose visceral.

3. OBJETIVO GERAL

Desenhar e testar *in silico* iniciadores para identificação específica de *L. infantum* por qPCR.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar *in silico* a especificidade dos iniciadores desenhados para *L. infantum* frente aos genomas humano, canino, de espécies da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Lutzomyia*.

5. METODOLOGIA

Foram projetados novos iniciadores para qPCR direcionados aos genes HSP60, CPB e G3PD de *L. infantum* por meio de análises de bioinformática, com o objetivo de avaliar, em nível *in silico*, a viabilidade de pares de iniciadores com potencial para amplificar regiões específicas do genoma dessa espécie. O delineamento buscou priorizar iniciadores com menor probabilidade teórica de amplificação cruzada com espécies filogeneticamente relacionadas ou

com sequências de hospedeiros, a ser confirmada em etapas subsequentes de validação experimental.

5.1. Prospecção dos genomas alvos

As sequências de interesse foram obtidas em bancos de dados públicos. Foi utilizado o The Kinetoplastid Genome Resource (TriTrypDB) (Aslett et al., 2010) para adquirir as sequências completas dos genes alvo de *L. infantum* e comparar com genomas de outros tripanosomatídeos (Aslett et al., 2010; Shanmugasundram et al., 2023). Também o GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi acessado para garantir a inclusão das versões mais recentes e completas das sequências depositadas. Esses bancos permitem a consulta de sequências gênicas com informações completas de anotação, bem como comparação entre sequências conservadas e variantes.

5.2. Identificação de genes ortólogos

Para avaliar a conservação funcional das regiões selecionadas, as sequências foram analisadas quanto à ortologia utilizando o TriTrypDB. Essa plataforma identifica proteínas ortólogas entre diferentes espécies de tripanosomatídeos com base na ancestralidade evolutiva, fornecendo informações sobre domínios funcionais e conservação estrutural. A análise abrangeu toda a família dos tripanossomatídeos, com atenção especial a espécies próximas de interesse epidemiológico, como *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

5.3. Desenho de iniciadores

Os iniciadores foram projetados com auxílio da plataforma Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Foram definidos parâmetros técnicos de desenho conforme critérios amplamente adotados para qPCR, incluindo comprimento dos iniciadores, temperatura de fusão (T_m), conteúdo de guanina citosina (GC) e tamanho esperado dos amplicons. Esses critérios visam otimizar a eficiência de anelamento e reduzir a probabilidade de formação de produtos inespecíficos.

Cada iniciador candidato foi avaliado *in silico* quanto à presença de regiões polimórficas e ao potencial de alinhamento com sequências de hospedeiros, vetores e de outros tripanossomatídeos, com o objetivo de estimar a especificidade dos pares de iniciadores antes das etapas de validação experimental.

5.4. Análises termodinâmicas

Os parâmetros termodinâmicos dos iniciadores escolhidos foram avaliados com a ferramenta OligoAnalyzer (*Integrated DNA Technologies* – IDT) com o objetivo de estimar o potencial de formação de estruturas secundárias (grampos) e tendência à formação de dímeros (auto ou heterodímeros). Essas análises são essenciais para identificar iniciadores com menor probabilidade de formar estruturas interferentes que comprometam a eficiência de amplificação.

5.5. Avaliação de especificidade

Após o desenho dos iniciadores, cada par foi submetido a uma etapa de validação preliminar *in silico* com o objetivo de avaliar a especificidade de amplificação para *L. infantum* e minimizar a possibilidade de reatividade cruzada com organismos não-alvo, por meio da plataforma Primer-BLAST. Para essa análise, os iniciadores foram comparados com sequências genômicas de espécies distintas, incluindo ser humano, cão, flebotomíneos e espécies da família *Trypanosomatidae*.

5.6. Simulação e validação da amplificação por e-PCR

A simulação e validação *in silico* da amplificação por e-PCR (Schuler, 1997), foram realizadas utilizando o software FastPCR, versão 6.9 (Kalendar et al., 2017), pertencente ao ‘Primer Digital’ (<https://primerdigital.com/fastpcr.html>), com o objetivo de avaliar o comportamento dos pares de iniciadores frente ao genoma de *L. infantum*. As sequências genômicas utilizadas como base para as análises foram obtidas no banco de dados do NCBI, utilizando o genoma de referência de *L. infantum* (cepa JPCM5), sob o assembly ASM287v2 (RefSeq GCF_000002875.2), composto por 36 cromossomos nucleares. A princípio este é o genoma mais completo sequenciado.

Os pares de oligonucleotídeos foram inseridos no FastPCR e submetidos à simulação de PCR *in silico* contra as sequências cromossômicas selecionadas. O modelo (*default*) do programa foi adotado, alterando-se apenas o intervalo de tamanho do amplicon desejado: entre 100 e 150 pares de bases. Para cada simulação, foram avaliados a presença de produtos amplificados, o número de sítios de ligação e o tamanho dos amplicons gerados.

6. RESULTADOS

Para cada gene alvo (*HSP60*, *CPB* e *G3PD*) foram desenhados pares de iniciadores que foram submetidos às etapas de avaliação termodinâmica, análise de especificidade e simulação

da amplificação por PCR *in silico*. Nesta seção, são apresentados os resultados completos dessas análises, obtidos por meio das ferramentas OligoAnalyzer, Primer-BLAST e FastPCR. Com base nos resultados gerados em cada etapa, foi possível caracterizar o desempenho dos iniciadores propostos. Os pares de iniciadores correspondentes a cada alvo estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Caracterização geral dos iniciadores gerados para *L. infantum*. As letras F e R na primeira coluna referem-se aos iniciadores diretos (*forward*) e reverso (*reverse*) respectivamente.

Identificador do iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon	Alvo
G3PDI.F	ATCAAGGTCGGCATCAACGG	124pb	G3PD
G3PDI.R	CAGCATTCGTGCTCATGTCC		
CPBI.F	GCGATGACAAAGACAATGGC	150pb	CPB
CPBI.R	TACTGCTGTTCAAGCACTCG		
HSP60I.F	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	104pb	HSP60
HSP60I.R	GCGTTGTCGTTGGTCAGC		

*pb: pares de bases

* G3PDI: iniciador para o gene gliceraldeído-3-fosfato

* CPBI: iniciador para o gene cisteína peptidase B

* HSP60I: iniciador para o gene proteína de choque térmico 60

A análise termodinâmica dos iniciadores selecionados foi realizada com a ferramenta OligoAnalyzer (IDT), considerando o potencial de formação de estruturas secundárias, como grampos e a tendência à formação de dímeros (autodímeros e heterodímeros). Os resultados indicaram que todas as estruturas apresentaram valores de ΔG (Energia livre ou de Gibbs) iguais ou menos negativas do que -6 kcal/mol, tanto para dímeros internos quanto para interações entre iniciadores, situando-se dentro da faixa considerada segura para PCR.

Adicionalmente, as estruturas secundárias previstas apresentaram valores de ΔG próximos de zero ou positivos, indicando baixa probabilidade de formação de grampos capazes de interferir na eficiência da amplificação. Esses resultados demonstram que os iniciadores selecionados apresentam propriedades termodinâmicas compatíveis com a amplificação por qPCR.

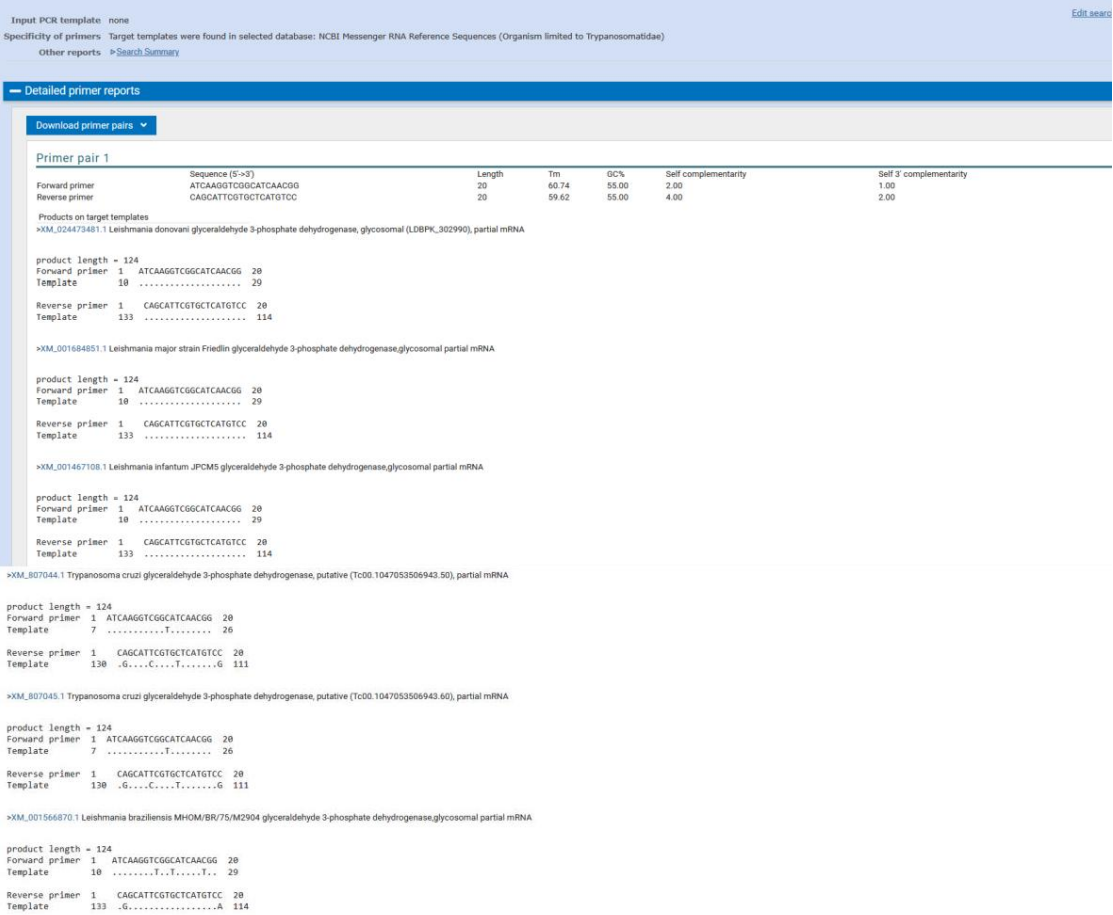
A análise de especificidade realizada com a ferramenta Primer-BLAST (Ye et al., 2012) indicou que, além de *L. infantum*, alguns iniciadores candidatos apresentaram alinhamentos

parciais com genomas de outras espécies, como *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, esses alinhamentos exibiram polimorfismos distribuídos ao longo das regiões de anelamento, com a presença de bases não complementares em diferentes posições dos iniciadores.

Na avaliação da especificidade em relação ao hospedeiro canino, a base de dados da ferramenta não disponibilizava, de forma unificada, o genoma completo de *Canis lupus familiaris*. Dessa forma, as buscas foram realizadas separadamente contra os genomas de *Canis* spp. e, posteriormente, de *C. lupus*.

Os resultados representativos das análises de especificidade dos iniciadores para cada alvo estão apresentados nas figuras subsequentes (Figuras 6A–D, 7A–D e 8A–D), ilustrando os alinhamentos obtidos frente aos genomas de humano, cão, *Lutzomyia* spp. e membros da família *Trypanosomatidae*.

Figura 6. Resultados representativos da análise de especificidade dos iniciadores para G3PD obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas da família *Trypanosomatidae*. Os pontos abaixo dos nucleotídeos referem-se a alinhamentos corretos. As letras A,T,C,G no ‘Template’ representam polimorfismos ou ausência de anelamento.



(B) cruzamento com o genoma canino
 Não foram identificados produtos de amplificação compatíveis com o iniciador G3PD no genoma do cão, indicando ausência de pareamento significativo e confirmando a especificidade do iniciador em relação ao DNA do hospedeiro. Gênero *Canis* (painel superior) e para *Canis lupus* (painel inferior), uma vez que o genoma anotado como *Canis lupus familiaris* não se encontra disponível na base do Primer-BLAST

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis)

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Download primer pairs ▾

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATCAAGGTCGGCATCAACGG	20	60.74	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CAGCATTCTGCTCATGTCC	20	59.62	55.00	4.00	2.00

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis lupus)

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Download primer pairs ▾

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATCAAGGTCGGCATCAACGG	20	60.74	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CAGCATTCTGCTCATGTCC	20	59.62	55.00	4.00	2.00

(C) cruzamento com o genoma humano (*Homo sapiens*).
 Não foram identificados produtos de amplificação compatíveis com o iniciador G3PD no genoma humano, indicando ausência de pareamento significativo e confirmando a especificidade do iniciador em relação ao DNA do hospedeiro.

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Download primer pairs ▾

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATCAAGGTCGGCATCAACGG	20	60.74	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CAGCATTCTGCTCATGTCC	20	59.62	55.00	4.00	2.00

(D) cruzamento com o genoma de *Lutzomyia* spp.
 Foram identificados dois possíveis produtos de amplificação no genoma do vetor. No entanto, ambos os alinhamentos apresentaram múltiplos polimorfismos distribuídos ao longo das regiões de anelamento do iniciador, indicando pareamento imperfeito e baixa probabilidade de amplificação eficiente no DNA do vetor.

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Lutzomyia)

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Download primer pairs ▾

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATCAAGGTCGGCATCAACGG	20	60.74	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CAGCATTCTGCTCATGTCC	20	59.62	55.00	4.00	2.00

Products on target templates

>NM_055835654.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (LOC129794793), transcript variant X1, mRNA

product length = 1375

Forward primer 1 ATCAAGGTCGGCATCAACGG 20

Template 1623 T..CG..G.....T 1642

Forward primer 1 ATCAAGGTCGGCATCAACGG 20

Template 2997 T.....AA..AT..... 2978

>NM_055835664.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (LOC129794793), transcript variant X2, mRNA

product length = 1375

Forward primer 1 ATCAAGGTCGGCATCAACGG 20

Template 1369 T..CG..G.....T 1388

Forward primer 1 ATCAAGGTCGGCATCAACGG 20

Template 2743 T.....AA..AT..... 2724

Figura 7. Resultados representativos da análise de especificidade do iniciador CPB obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas da família *Trypanosomatidae*.

A análise indicou amplificação exclusiva para *L. infantum*. Não foram identificadas combinações de iniciadores com *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* ou *Trypanosoma cruzi*, evidenciando alta especificidade do par de iniciadores para o alvo CPB em *L. infantum*.

Input PCR template: none [Edit search](#)

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Trypanosomatidae)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCATGACAAAGACAATGGC	20	58.10	50.00	3.00	3.00
Reverse primer	TACTGCTGTTCAAGCACTCG	20	58.22	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>>XM_001463394.1 Leishmania infantum JPCMS cathepsin L-like protease partial mRNA

product length = 150

Forward primer 1 GCATGACAAAGACAATGGC 20

Template 542 561

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 691 672

>>XM_003392190.1 Leishmania infantum JPCMS cathepsin L-like protease partial mRNA

product length = 150

Forward primer 1 GCATGACAAAGACAATGGC 20

Template 542 561

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 691 672

>>XM_003858609.1 Leishmania donovani cathepsin L-like protease (LDBPK_080960), partial mRNA

product length = 150

Forward primer 1 GCATGACAAAGACAATGGC 20

Template 542 561

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 691 672

(B) cruzamento com o genoma canino.

A análise não identificou produtos de amplificação no genoma do cão, indicando ausência de pareamento relevante entre os iniciadores e sequências do hospedeiro. Gênero *Canis* (painel superior) e para *Canis lupus* (painel inferior), uma vez que o genoma anotado como *Canis lupus familiaris* não se encontra disponível na base do Primer-BLAST

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCATGACAAAGACAATGGC	20	58.10	50.00	3.00	3.00
Reverse primer	TACTGCTGTTCAAGCACTCG	20	58.22	50.00	4.00	2.00

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis lupus)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGAAGTGGGATCAACGG	20	60.74	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CAGCATTGCTGCTCATGTCC	20	59.62	55.00	4.00	2.00

(C) cruzamento com o genoma humano (*Homo sapiens*).

Foram observados poucos alinhamentos potenciais no genoma humano. No entanto, todos apresentaram múltiplos polimorfismos distribuídos ao longo das regiões de anelamento do iniciador, sugerindo baixa eficiência de amplificação em DNA humano.

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

[Download primer pairs](#)

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGATGACAAAGACAATGGC	20	58.10	50.00	3.00	3.00
Reverse primer	TACTGCTGTTCAAGCACTCG	20	58.22	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>NM_001304564.2 Homo sapiens mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1), transcript variant 2, mRNA, nuclear gene for mitochondrial product

product length = 43

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 529 AG.....T.G..T.... 548

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 571 .A..GC.....T..... 552

>NM_019008.6 Homo sapiens mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1), transcript variant 1, mRNA, nuclear gene for mitochondrial product

product length = 43

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 519 AG.....T.G..T.... 538

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 561 .A..GC.....T..... 542

(D) cruzamento com o genoma de *Lutzomyia spp.*

A análise revelou poucos alinhamentos potenciais no genoma do vetor, todos com elevado número de polimorfismos ao longo do iniciador, indicando pareamento imperfeito e reduzida probabilidade de amplificação eficiente.

Input PCR template: none [Edit search](#)

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Lutzomyia)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

[Download primer pairs](#)

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGATGACAAAGACAATGGC	20	58.10	50.00	3.00	3.00
Reverse primer	TACTGCTGTTCAAGCACTCG	20	58.22	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>XM_055829800.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis nose resistant to flucetane protein 6-like (LOC129791576), mRNA

product length = 426

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 1753 AA.....T..AT.... 1734

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 1328 .G.....TC..G.G... 1347

>XM_055839481.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis protein hu-li tai shao (LOC129797150), transcript variant X6, mRNA

product length = 563

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 1399G.C..C.G6.... 1388

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 837 ..T.T....TC.....A 856

>XM_055839476.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis protein hu-li tai shao (LOC129797150), transcript variant X1, mRNA

product length = 563

Forward primer 1 GCGATGACAAAGACAATGGC 20

Template 1399G.C..C.G6.... 1388

Reverse primer 1 TACTGCTGTTCAAGCACTCG 20

Template 837 ..T.T....TC.....A 856

Figura 8. Resultados representativos da análise de especificidade do iniciador HSP60 obtidos por Primer-BLAST. (A) cruzamento com genomas da família *Trypanosomatidae*.

A análise indicou alinhamentos com *L. infantum* e com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, incluindo *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*. No entanto, todos os alinhamentos em espécies não-alvo apresentaram múltiplos polimorfismos distribuídos ao longo das regiões de anelamento do iniciador.

Input PCR template: none [Edit search](#)

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Trypanosomatidae)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20	60.32	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18	59.75	61.11	2.00	2.00

Products on target templates

>XM_001467832.1 *Leishmania infantum* JPCMS putative chaperonin HSP60, mitochondrial precursor partial mRNA

product length = 184

Forward primer	1	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20
Template	190	T.....G..	209
Reverse primer	1	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18
Template	293	C.....T	276

>XM_003863562.1 *Leishmania donovani* chaperonin HSP60, mitochondrial precursor, putative (LDBPK_321940), partial mRNA

product length = 184

Forward primer	1	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20
Template	190	T.....G..	209
Reverse primer	1	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18
Template	293	C.....T	276

>XM_005433.1 *Trypanosoma cruzi* dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative (Tc00.1047053511007.10), partial mRNA

product length = 2801

Reverse primer	1	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18
Template	6281	A.....C..C.C....	6264
Reverse primer	1	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18
Template	3481	T.C.C..T.....	3498

>XM_001562353.2 *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 conserved hypothetical protein partial mRNA

product length = 673

Forward primer	1	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20
Template	7011	TGT.....C..A.....	7030
Forward primer	1	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20
Template	7683	C.CA.C....	7664

>XM_001567508.2 *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 putative chaperonin HSP60, mitochondrial precursor partial mRNA

product length = 184

Forward primer	1	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20
Template	190	T.....G..	209
Reverse primer	1	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18
Template	293	C.....T	276

(B) cruzamento com o genoma canino

A análise não identificou produtos de amplificação no genoma do cão, indicando ausência de pareamento relevante entre os iniciadores e sequências do hospedeiro. Gênero *Canis* (painel superior) e para *Canis lupus* (painel inferior), uma vez que o genoma anotado como *Canis lupus familiaris* não se encontra disponível na base do Primer-BLAST.

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGGATGGAGTCACGGTTGC	20	60.32	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GCCTTGTCGTTGGTCAGC	18	59.75	61.11	2.00	2.00

Input PCR template: none [Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Canis lupus)

Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGATGACAAAGACAATGGC	20	58.10	50.00	3.00	3.00
Reverse primer	TACTGCTGTTCAGCACTCG	20	58.22	50.00	4.00	2.00

(C) cruzamento com o genoma humano (*Homo sapiens*).

Não foram observados alinhamentos ou produtos de amplificação potenciais no genoma humano, indicando ausência de correspondência significativa entre os iniciadores e sequências humanas.

Input PCR template: none Edit search NEW						
Specificity of primers: No target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Homo sapiens)						
Other reports: Search Summary						
— Detailed primer reports						
Download primer pairs						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAGATGAGTCACGCTTGC	20	60.32	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GCCTTGTCTGTTGTCAGC	18	59.75	61.11	2.00	2.00

(D) cruzamento com o genoma de *Lutzomyia* spp.

Foram identificados poucos alinhamentos potenciais no genoma do vetor. Esses alinhamentos apresentaram polimorfismos ao longo das regiões de anelamento do iniciador, sugerindo pareamento imperfeito.

Input PCR template: none Edit search NEW						
Specificity of primers: Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Lutzomyia)						
Other reports: Search Summary						
— Detailed primer reports						
Download primer pairs						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAGATGAGTCACGCTTGC	20	60.32	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GCCTTGTCTGTTGTCAGC	18	59.75	61.11	2.00	2.00
Products on target templates						
x3M_55583123.1 PREDICTED: Lutzomyia longipalpis mucin-2 like (LOC129792841).mRNA						
product length = 3118						
Reverse primer	1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18					
Template	3238 .G....T.....G.. 3221					
Reverse primer 1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18						
Template	121 .T.G..G.....A. 138					
product length = 556						
Reverse primer	1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18					
Template	676 .A....T.....G.. 659					
Reverse primer 1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18						
Template	121 .T.G..G.....A. 138					
product length = 2382						
Reverse primer	1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18					
Template	2422 .T..A..T.....G.. 2405					
Reverse primer 1 GCCTTGTCTGTTGTCAGC 18						
Template	121 .T.G..G.....A. 138					

A simulação da amplificação por e-PCR, utilizando os iniciadores desenhados para o alvo CPB indicou a ocorrência de amplificação exclusivamente no cromossomo 8 de *L. infantum*. Nesse cromossomo, foram identificados sítios de ligação para os iniciadores direto e reverso em orientação convergente e a uma distância compatível com a geração de produtos amplificados.

No cromossomo 8, os iniciadores direto e reverso apresentaram alinhamento perfeito, com 100% de identidade, em duas regiões genômicas complementares, localizadas nas posições 408014–408033 e 408144–408163, bem como nas posições 410775–410794 e 410905–410924. O iniciador direto apresentou temperatura de melting (Tm) de 60,8 °C, enquanto o iniciador reverso apresentou Tm de 55,9 °C. A combinação desses alinhamentos resultou na predição de um amplicon de 150 pares de bases, com temperatura de anelamento estimada em 65 °C.

Para os demais cromossomos analisados, não foram previstas amplificações *in silico*, uma vez que não foram identificados pares de sítios de ligação que atendessem simultaneamente aos critérios de orientação, distância e tamanho de amplicon definidos na análise.

Para o gene G3PD, não foi prevista amplificação por PCR *in silico*. Observou-se alinhamento apenas do iniciador direto no cromossomo 8 do genoma de *L. infantum*, sem pareamento correspondente do iniciador reverso, o que inviabilizou a formação de amplicon nas condições avaliadas.

Com relação aos iniciadores desenhados para o gene HSP60, os resultados indicaram amplificação predita exclusivamente no cromossomo 32, sem detecção de produtos amplificados em outros cromossomos do genoma analisado. Os iniciadores direto e reverso apresentaram 100% de identidade com a sequência-alvo, alinhando-se em orientação convergente nas posições 722937–722954 e 723021–723040, respectivamente.

As temperaturas de melting (T_m) estimadas foram de 59,6 °C para o iniciador direto e 60,1 °C para o iniciador reverso. A amplificação predita resultou em um amplicon de 104 pares de bases, com temperatura de anelamento estimada em 68 °C. Não foram observadas amplificações inespecíficas ou múltiplos produtos no genoma de referência avaliado.

Os resultados da simulação da amplificação por e-PCR obtidos com o software FastPCR estão ilustrados nas figuras (9, 10 e 11) abaixo.

Figura 9. Resultado da e-PCR para os iniciadores CPBI no software FastPCR (versão 6.9). Apresentando o alinhamento dos iniciadores e a predição do amplicon no cromossomo 8.

```
In silico Primer(s) search for: nc_009392.2 leishmania infantum jpcm5 genome chromosome 8
seqf 5'-gcgatgacaaagacaatggc

Position: 408144<-408163    100%    Tm = 55,9°C

<-cggtaacagaaacagtagcg-5
|||||
cagccattgtctttgtcatcgagct

Position: 410905<-410924    100%    Tm = 55,9°C

<-cggtaacagaaacagtagcg-5
|||||
cagccattgtctttgtcatcgagct

seqr 5'-tactgctgttcaagcactcg

Position: 408014->408033    100%    Tm = 60,8°C

5-tactgctgttcaagcactcg->
|||||
tttactgctgttcaagcactcgcca

Position: 410775->410794    100%    Tm = 60,8°C
```

```

5-tactgctgttcaagcactcg->
  |||
tttactgctgttcaagcactcggcca

Position: 408144<-408163    100%    Tm = 55,9°C

<-cggtaacagaaacagtagcg-5
  |||
cagccattgtctttgtcatcgcagct

>seqr 408014->408033
  5'-tactgctgttcaagcactcg
>seqf 408144<-408163
  5'-gcgatgacaaagacaatggc

Amplicon size: 150bp Ta=65°C

Position: 410775->410794    100%    Tm = 60,8°C

5-tactgctgttcaagcactcg->
  |||
tttactgctgttcaagcactcggcca

Position: 410905<-410924    100%    Tm = 55,9°C

<-cggtaacagaaacagtagcg-5
  |||
cagccattgtctttgtcatcgcagct

>seqr 410775->410794
  5'-tactgctgttcaagcactcg
>seqf 410905<-410924
  5'-gcgatgacaaagacaatggc

Amplicon size: 150bp Ta=65°C

```

Figura 10. Resultado da e-PCR para os iniciadores G3PDI no software FastPCR (versão 6.9). Apresentando o alinhamento apenas no iniciador direto no cromossomo 8

```

In silico Primer(s) search for: nc_009392.2 leishmania infantum jpcm5 genome chromosome 8
seqf 5'-atcaaggtcggcatcaacgg

Position: 435514->435533    80%    Tm = 52,0°C

5-atcaaggtcggcatcaacgg->
  ||| |||
accgaaggccggcatcaacggtggc

```

Figura 11. Resultado da e-PCR para os iniciadores HSP60I no software FastPCR (versão 6.9). Apresentando o alinhamento dos iniciadores e a predição do amplicon no cromossomo 32.

```

In silico Primer(s) search for: nc_009416.2 leishmania infantum jpcm5 genome chromosome 32
seqr 5'-gcgttgctcgttggtcagc

Position: 722937->722954    100%    Tm = 59,6°C

5-gcgttgctcgttggtcagc->
|||||
cggcgttgctcgttggtcagccctg

seqf 5'-aaggatggagtcacggttgc

Position: 723021<-723040    100%    Tm = 60,1°C

<-cgttggcactgaggtaggaa-5
|||||
tggcaaccgtgactccatccttggtg

Position: 722937->722954    100%    Tm = 59,6°C

5-gcgttgctcgttggtcagc->
|||||
cggcgttgctcgttggtcagccctg

Position: 723021<-723040    100%    Tm = 60,1°C

<-cgttggcactgaggtaggaa-5
|||||
tggcaaccgtgactccatccttggtg

>seqr 722937->722954
5'-gcgttgctcgttggtcagc
>seqf 723021<-723040
5'-aaggatggagtcacggttgc

Amplicon size: 104bp Ta=68°C

```

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram selecionados três pares de iniciadores direcionados a genes bem caracterizados de *L. infantum*: *HSP60*, *CPB* e *G3PD*. A escolha desses alvos baseou-se na disponibilidade de sequências de referência bem anotadas na base de dados TriTrypDB (Shanmugasundram et al., 2023; Aslett et al., 2010), que reúne informações genômicas com delimitação precisa das regiões codificantes e anotações funcionais consolidadas.

A utilização de sequências de referência confiáveis é particularmente relevante em análises *in silico*, uma vez que ferramentas de avaliação de especificidade, como o Primer-

BLAST, dependem diretamente da qualidade e abrangência dos genomas disponíveis nas bases de dados para a identificação de potenciais alinhamentos não desejados (Ye et al., 2012). Dessa forma, inconsistências ou imprecisões nas sequências de entrada podem comprometer a interpretação dos resultados de especificidade. Nesse contexto, a priorização de genes bem caracterizados e provenientes de bases de dados curadas contribui para a robustez e a reprodutibilidade das análises realizadas.

Um aspecto central no desenho de iniciadores é a correta identificação e caracterização da sequência-alvo. Conforme destacado por Bustin e Huggett (2017), um ensaio de qPCR só é efetivamente informativo quando o alvo correto é utilizado desde as etapas iniciais de desenvolvimento, sendo a qualidade das informações disponíveis em bancos de dados de sequências um fator determinante para o desempenho do ensaio. Os autores alertam que sequências incorretas depositadas em bases de dados, por exemplo, em decorrência de amplificações não específicas, podem gerar um ciclo de erros que se propaga em análises subsequentes, comprometendo a especificidade e a reprodutibilidade dos resultados.

Nesse contexto, a escolha de genes conservados como alvos para o desenho dos iniciadores neste estudo constituiu uma estratégia deliberada. De modo geral, esses genes estão associados a anotações mais consistentes nos bancos de dados genômicos (Kuznetsov et al., 2023; Cantalapiedra et al., 2021). Dessa forma, em comparação com regiões repetitivas ou multicópias pouco caracterizadas, eles apresentam menor risco de erros decorrentes de montagens incompletas ou incorretas (Alam et al., 2025; Tegenfeldt et al., 2025; Rodrigues, 2017).

No entanto, genes ortólogos apresentam maior conservação entre espécies filogeneticamente próximas, o que pode predispor à ocorrência de amplificações inespecíficas (Langschied et al., 2024; Kirilenko et al., 2023). Nesse sentido, a escolha de genes bem anotados visou garantir a confiabilidade das sequências de referência, enquanto a especificidade foi assegurada pela seleção criteriosa de regiões-alvo e pela aplicação de análises *in silico* rigorosas, conforme recomendado na literatura (Ye et al., 2012; Bustin & Huggett, 2017; Stadhouders et al., 2010).

Estratégias de desenho de iniciadores baseadas na comparação de sequências ortólogas entre espécies permitem a identificação de regiões adequadas para amplificação, conciliando conservação estrutural e especificidade diagnóstica (Li et al., 2023). Assim, ao priorizar genes ortólogos bem definidos, buscou-se reduzir a probabilidade de falhas de amplificação e aumentar a confiabilidade dos iniciadores propostos para aplicação em ensaios de PCR (Zhao et al., 2021; Kim et al., 2015).

A elevada conservação das regiões de minicírculos do kDNA, embora contribua para alta sensibilidade na detecção molecular, tem sido associada à amplificação cruzada entre diferentes espécies de *Leishmania*. Esse aspecto impõe a necessidade de uma avaliação rigorosa da especificidade dos iniciadores e das condições de reação em ensaios baseados nessas regiões (Pareyn et al., 2020; Cecarelli et al., 2017; Kocher et al., 2017).

Além disso, a análise de polimorfismos nas regiões-alvo permite identificar variações genéticas intraespecíficas que podem comprometer a eficiência da amplificação, resultando em falsos negativos ou na subestimação da diversidade genética do parasito (Zemanova et al., 2015; Toledo et al., 2002). Estudos demonstram que iniciadores desenhados a partir de regiões conservadas, mas que consideram polimorfismos previamente descritos, apresentam melhor desempenho diagnóstico e maior robustez, sendo especialmente relevantes para metodologias como PCR multiplex e PCR-RFLP (Bento et al., 2024; Oshaghi et al., 2009).

Dessa forma, a integração de análises *in silico* voltadas tanto à especificidade quanto à identificação de polimorfismos constitui uma etapa crítica no desenho de iniciadores para diagnóstico molecular, conforme adotado no presente estudo (Haber et al., 2025; Da Silva et al., 2019).

Um achado relevante das análises de especificidade *in silico* foi a identificação de alinhamentos dos iniciadores com espécies não alvo em posições genômicas correspondentes aos sítios observados em *L. infantum*. Esse padrão reflete a conservação sintênica descrita entre os genomas de espécies do gênero *Leishmania*, amplamente documentada na literatura (Peacock, 2007), e indica que as regiões avaliadas compartilham organização estrutural semelhante entre espécies filogeneticamente relacionadas.

Entretanto, esses alinhamentos inespecíficos ocorreram de forma incompleta, com a presença de múltiplos polimorfismos distribuídos ao longo das regiões de anelamento dos iniciadores, envolvendo espécies de *Leishmania*, outros *Tripanossomatídeos* e, em alguns casos, o vetor. Estudos experimentais demonstram que incompatibilidades entre iniciador e sequência-alvo reduzem a estabilidade do pareamento e comprometem a eficiência da amplificação, independentemente da posição do desajuste ao longo do iniciador (Stadhouders et al., 2010). Ainda segundo esses autores, desajustes localizados na extremidade 3' exercem impacto particularmente significativo sobre a iniciação da extensão pela DNA polimerase.

Em consonância com esses achados, Huang et al. (2024) demonstraram que mesmo um único polimorfismo na extremidade 3' do iniciador pode resultar em reduções acentuadas da eficiência de amplificação, chegando a quedas de até 100%, com eficiência próxima de 0–4%. Assim, a presença de múltiplos desajustes distribuídos ao longo das regiões de anelamento

observadas neste estudo torna improvável a obtenção de produtos amplificados em espécies não alvo, reforçando a especificidade dos iniciadores desenvolvidos para *L. infantum*.

O desempenho de ensaios de qPCR depende diretamente das propriedades termodinâmicas dos iniciadores, uma vez que parâmetros inadequados favorecem a formação de dímeros, estruturas secundárias e amplificações inespecíficas, comprometendo a sensibilidade e a confiabilidade da reação (Bustin, 2019; Bustin, 2017). Dessa forma, a avaliação termodinâmica constitui uma etapa indispensável no processo de desenho de iniciadores.

No presente estudo, a análise termodinâmica incluiu a predição da formação de grampos e dímeros com base nos valores de energia livre de Gibbs (ΔG). Na avaliação *in silico* de iniciadores, o ΔG é um indicador da estabilidade termodinâmica das possíveis interações e estruturas secundárias formadas pelos oligonucleotídeos, sendo estimado por modelos do tipo *nearest neighbor* em ferramentas como o OligoAnalyzer (Lopes-Luz et al., 2025; Johnston et al., 2019; Mann et al., 2009).

De modo geral, iniciadores que apresentam valores de ΔG menos negativos exibem menor propensão à formação de estruturas secundárias estáveis, favorecendo a eficiência da reação de PCR. Guias usuais em ferramentas de *design*, frequentemente sugerem valores de ΔG para auto e heterodímeros próximos ou menos negativos do que -6 kcal/mol como referência para reduzir a formação de dímeros estáveis, enquanto grampos com ΔG menos negativos do que aproximadamente -2 a -3 kcal/mol são considerados pouco prováveis de interferir na amplificação. Contudo é importante mencionar que não há consenso único em estudos comparativos em relação a esses valores (Benchling, 2025; Johnston et al., 2019; Meagher et al., 2018).

À luz desses critérios, os iniciadores selecionados apresentaram características termodinâmicas adequadas. As análises conduzidas com o OligoAnalyzer indicaram valores de ΔG compatíveis com baixa tendência à formação de estruturas secundárias estáveis, sugerindo reduzida competição com o anelamento ao alvo e favorecendo a eficiência da amplificação.

A simulação da amplificação por e-PCR para o alvo CPB, localizado no cromossomo 8 de *L. infantum*, apresentou alinhamento perfeito dos iniciadores com a sequência-alvo e ausência de amplificação em outros cromossomos, indicando alta especificidade. Esses achados corroboram estudos que destacam a importância do desenho criterioso de iniciadores para minimizar amplificações cruzadas e assegurar a confiabilidade de ensaios moleculares (Losada-Barragán et al., 2016; Bento et al., 2024). A previsão de um amplicon de tamanho adequado, com temperaturas de *melting* e anelamento compatíveis, reforça o potencial técnico do ensaio,

alinhando-se a metodologias previamente validadas para a detecção específica de *L. infantum* (Ortega et al., 2017).

Embora tenha sido observada elevada especificidade, a presença de múltiplos sítios potenciais de ligação dos iniciadores no genoma devem ser considerada. Múltiplos alvos podem gerar competição durante a PCR, reduzindo a eficiência da amplificação e dificultando a interpretação dos produtos, especialmente em ensaios quantitativos ou em análises de sequenciamento. O desenho ideal de iniciadores deve priorizar o flanqueamento de um único alvo genômico, minimizando a formação de produtos múltiplos e assegurando maior sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio (Bustin, 2017; Zhao et al., 2021).

É importante enfatizar que os resultados desta etapa derivam de simulações computacionais. Embora a PCR *in silico* constitua uma ferramenta robusta para triagem inicial e refinamento do desenho de iniciadores, a validação experimental permanece indispensável. Diretrizes consolidadas, como as recomendações MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) destacam a necessidade de testes empíricos para confirmação da especificidade, eficiência de amplificação e ausência de produtos inespecíficos, além do ajuste de parâmetros como temperatura de anelamento e concentração de iniciadores (Bustin, 2017).

Para o gene G3PD, a análise *in silico* não indicou a formação de amplicon, pois apenas o iniciador direto apresentou alinhamento ao cromossomo 8, sem região complementar para o iniciador reverso nas condições avaliadas. A ausência de flanqueamento da sequência-alvo inviabiliza, conceitualmente, a amplificação por PCR, uma vez que a reação depende do pareamento orientado de ambos os oligonucleotídeos (Wang et al., 2019; Bustin, 2017). Esses resultados reforçam a importância da validação *in silico* como etapa de triagem prévia, evitando o avanço de iniciadores estruturalmente inadequados e orientando o redesenho com base em regiões conservadas do gene e em critérios rigorosos de análise (Trigo et al., 2021; Araújo et al., 2023).

A análise *in silico* dos iniciadores para o gene HSP60 indicou um único amplicon no cromossomo 32, com tamanho adequado (104 pb) e identidade completa (100%) dos iniciadores com a sequência-alvo, sugerindo elevada especificidade e potencial eficiência. Não foram previstas amplificações inespecíficas ou múltiplos produtos, em conformidade com boas práticas para ensaios de qPCR (Bustin, 2017). Entretanto, a possibilidade de reconhecimento do genoma de *L. braziliensis* deve ser considerada. Embora tenha sido prevista a formação de um amplicon de tamanho semelhante ao de *L. infantum*, foram identificados polimorfismos na extremidade 3' dos iniciadores. *Mismatches* nessa região podem reduzir a eficiência da

amplificação (Kwok et al., 1999; Huang et al., 2024). Esses achados reforçam a necessidade de validação experimental frente a espécies geneticamente próximas, sem, no entanto, inviabilizar o uso do par de iniciadores

A realização de análises prévias *in silico* constitui uma etapa fundamental no desenvolvimento de ensaios de PCR, uma vez que permite antecipar limitações relacionadas à especificidade dos iniciadores, à sua viabilidade estrutural e ao comportamento esperado da amplificação (Bustin & Huggett, 2017; Kalendar et al., 2017). Essas abordagens computacionais fornecem subsídios objetivos para a tomada de decisão antes da validação experimental, contribuindo para o desenho racional de iniciadores.

Por meio dessas ferramentas, torna-se possível identificar precocemente problemas potenciais, como a presença de múltiplos sítios de ligação no genoma alvo, incompatibilidades termodinâmicas entre os iniciadores ou ausência de formação de amplicon, aspectos que podem comprometer a eficiência e a confiabilidade do ensaio (Qu et al., 2012; Wang et al., 2019; Kalendar et al., 2024).

Dessa forma, só é possível presumir sobre o sucesso de um ensaio realizando seus próprios experimentos de validação e otimização. Esse é um ponto importante antes de se trabalhar com amostras clínicas para economizar tempo, reduzir custos e minimizar ou preferencialmente eliminar falhas ou inconsistências na bancada.

Uma perspectiva desse estudo, é que em etapa subsequente, os iniciadores selecionados deverão ser submetidos à validação em bancada, utilizando parasitos cultivados e amostras biológicas provenientes de animais naturalmente infectados. Isto permitirá avaliar o desempenho dos iniciadores em condições reais de diagnóstico molecular, considerando variabilidade de carga parasitária e matriz biológica. Essas etapas constituem um encaminhamento lógico para estudos futuros, especialmente no contexto de aprofundamento metodológico em nível de doutorado.

8. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos três pares de iniciadores direcionados aos genes HSP60, CPB e G3PD de *L. infantum*, com base em sequências de referência bem anotadas e criteriosamente selecionadas. As análises *in silico* iniciais, incluindo avaliação termodinâmica e de especificidade, indicaram desempenho favorável para os três pares de iniciadores, justificando o prosseguimento para a etapa de simulação da amplificação por PCR.

Na simulação da PCR *in silico*, o alvo HSP60 destacou-se por apresentar um único sítio de amplificação previsto, enquanto o alvo CPB, apesar de específico, apresentou múltiplos

sítios potenciais de ligação, aspecto que deve ser considerado em etapas posteriores de validação. Em contraste, o par de iniciadores desenhado para o gene G3PD não apresentou viabilidade estrutural para a formação de amplicon e foi excluído com base nos critérios adotados nessa etapa. Em conjunto, os resultados reforçam a importância da validação *in silico* como etapa crítica no desenvolvimento de ensaios de PCR, contribuindo para a redução de falhas experimentais e para o direcionamento eficiente das etapas subsequentes de validação em bancada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, Kamel A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 91-95, 2003.

ABBASZADEH Afshar, M., ELIKAEE, S., SABERI, R. et al. Expression analysis of centrin gene in promastigote and amastigote forms of leishmania infantum iranian isolates: a promising target for live attenuated vaccine development against canine leishmaniasis. **BMC Vet Res** 17, 162 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02816-x>

AGALLOU, Maria et al. Identification of immunoreactive Leishmania infantum protein antigens to asymptomatic dog sera through combined immunoproteomics and bioinformatics analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149894, 2016.

ANAND, Apeksha et al. Molecular, structural, and functional characterization of delta subunit of T-complex protein-1 from Leishmania donovani. **Infection and Immunity**, v. 92, n. 10, p. e00234-24, 2024.

ANVERSA, Laís et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.

ALAM, Md Nafis Ul et al. Universal orthologs infer deep phylogenies and improve genome quality assessments. **BMC biology**, v. 23, n. 1, p. 224, 2025.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan 2010.

ARÁNYI, T., VÁRADI, A., SIMON, I. et al. The BiSearch web server. **BMC Bioinformatics** 7, 431 (2006). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-431>.

ARYA, Manit et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGU, L. Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 52, n. 6, p. 1359-1375, 2022. DOI: 10.1016/j.cvsm.2022.06.012.

BENTO, Gabrielle A. et al. Development of species-specific multiplex PCR for Leishmania identification. **Acta Tropica**, v. 260, p. 107440, 2024.

BENIKHLEF, Razika et al. ITS1 and cpb genetic polymorphisms in Algerian and Tunisian Leishmania infantum isolates from humans and dogs. **Zoonoses and Public Health**, v. 70, n. 3, p. 201-212, 2023.

BENCHLING. Primer design for PCR. [S. l.], 2025. Disponível em: <https://www.benchling.com/primer-design-for-pcr>. Acesso em: 19 dez. 2025.

BIVONA, A.E, et al. Recombinant cysteine proteinase B from *Leishmania braziliensis* and its domains: Promising antigens for serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, 57(11), e00819-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00819-19>.

BLACK, Jennifer A. et al. Life in plastic, it's fantastic! How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 13, p. 1102462, 2023.

BUSSOTTI, Giovanni et al. Nuclear and mitochondrial genome sequencing of North-African *Leishmania infantum* isolates from cured and relapsed visceral leishmaniasis patients reveals variations correlating with geography and phenotype. **Microbial genomics**, v. 6, n. 10, p. e000444, 2020..

BUSTIN S, Huggett J. qPCR primer design revisited. **Biomol Detect Quantif**. 2017;14:19-28. Published 2017 Nov 22. doi:10.1016/j.bdq.2017.11.001

BUSTIN, Stephen A.; MUELLER, Reinhold; NOLAN, Tania. Parameters for successful PCR primer design. In: **Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 5-22.

BUSTIN, Stephen A. et al. MIQE 2.0: Revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. **Clinical Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 634-651, 2025.

BUSTIN, Stephen A. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. **Molecular aspects of medicine**, v. 96, p. 101249, 2024.

CAMACHO, E. et al. *Leishmania infantum* (JPCM5) transcriptome, gene annotation and structure. **Scientific Data**, v. 10, n. 1, p. 194, 2023. DOI: 10.1038/s41597-023-02032-4.

CAMACHO, Esther et al. Complete assembly of the *Leishmania donovani* (HU3 strain) genome and transcriptome annotation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6127, 2019.

CANTALAPIEDRA, Carlos P. et al. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 12, p. 5825-5829, 2021.

CARNIELLI J.B.T., GRANDI G., COELHO A.C, et al. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with treatment failure. **EBioMedicine**. 2018;36:368-375. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.

CARSON, C. et al. Comparison of *Leishmania* OligoC-TesT PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3325-3330, 2010. DOI: 10.1128/JCM.02331-09.

CARVALHO, KSS, da Silva Júnior, et al. Aplicação de sequenciamento de nova geração (NGS) para análise descritiva de 30 genomas de isolados de *Leishmania infantum* no Centro-Norte do Brasil. **Sci Rep** 10, 12321 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68953-9>.

CASTANHEIRA, Gabriel Victor et al. High detection rate of parasitic load by qPCR targeting 18S rDNA in blood of patients with active leishmaniasis lesions. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 44, n. 3, p. 717-728, 2025.

Ceccarelli, M., et al. Evaluation of a kDNA-Based qPCR Assay for the Detection and Quantification of Old World Leishmania Species. **Microorganisms** 2020, 8, 2006. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122006>.

CECCARELLI, M., et al. The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between Leishmania (L.) infantum and Leishmania (L.) amazonensis. **Parasites Vectors** 10, 239 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x>.

CECCARELLI M, GALLUZZI L, MIGLIAZZO A, MAGNANI M. Detecção e caracterização de Leishmania (Leishmania) e Leishmania (Viannia) por PCR em tempo real baseado em SYBR Green e análise de curva de fusão de alta resolução direcionada ao DNA minicircular do cinetoplasto. **PLoS One**. 2014;9:e88845.

CHAOUCH, Melek et al. Identification of Tunisian Leishmania spp. by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 357-365, 2013.

CHAVALI, Sreenivas et al. Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. **Bioinformatics**, v. 21, n. 20, p. 3918-3925, 2005

CHICHARRO, Carmen et al. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis in Spain: Development and Validation of Ready-To-Use Gel-Form Nested and Real-Time PCRs To Detect Leishmania spp. **Microbiology spectrum**, v. 11, n. 3, p. e03354-22, 2023.

CHUKWUEMEKA, Prosper Obed et al. In silico design and validation of a highly degenerate primer pair: a systematic approach. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 72, 2020.

COLINEAU, Lucie et al. Leishmania donovani chaperonin 10 regulates parasite internalization and intracellular survival in human macrophages. **Medical microbiology and immunology**, v. 206, n. 3, p. 235-257, 2017. doi:10.1007/s00430-017-0500-7.

CONTER, Carolina Cella et al. PCR primers designed for new world Leishmania: a systematic review. **Experimental Parasitology**, v. 207, p. 107773, 2019.

CUPOLILLO, Elisa et al. Occurrence of multiple genotype infection caused by Leishmania infantum in naturally infected dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0007986, 2020.

DA SILVA, Leonardo Alves et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 77-83, 2010. doi:10.1016/j.meegid.2009.11.001.

DA SILVA, Ryan Emiliano et al. Exploring Leishmania infantum cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 895, 2019.

DAMASCENO, Jeziel D. et al. Conditional knockout of RAD51-related genes in Leishmania major reveals a critical role for homologous recombination during genome replication. **PLoS genetics**, v. 16, n. 7, p. e1008828, 2020.

ARAÚJO, Helton Krisman et al. Limitation of primers used in PCR for the characterization of *Leishmania infantum*. **The Journal of Parasitology**, v. 109, n. 5, p. 445-449, 2023.

DE CASSIA-PIRES, Renata et al. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173922, 2017., doi:10.1371/journal.pone.0173922.

DE LUNA, Rafaela Lira Nogueira et al. Rapid isothermal molecular tests to discriminate between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* infections in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 18, n. 1, p. 2, 2025.

DUFF, Aoife M. et al. Counting soil microbial communities: the impact of qPCR platform and mastermix on accuracy and precision. **FEMS microbiology ecology**, v. 101, n. 8, p. fiae073, 2025.

EL BAIDOURI, Fouad et al. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2255, 2013.

EL HAMOUCHI, Adil et al. Intraspecific genetic variability in a population of Moroccan *Leishmania infantum* revealed by PCR-RFLP of kDNA minicircles. **Acta tropica**, v. 169, p. 142-149, 2017.

EL MAZINI, Sara et al. Genetic diversity and population structure of *Leishmania infantum* in Morocco as revealed by multilocus sequence typing (MLST) approach. **Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 785, 2023.

FILGUEIRA, Camila Patricio Braga et al. Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008750, 2020.

FLORÊNCIO, Monique; CUPOLILLO, Elisa; BOITÉ, Mariana Côrtes. Understanding the genetic complexity of *Leishmania infantum* in the Americas: a focus on 3'NT/NU gene deletion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 120, p. e240160, 2024.

FRANSSEN, Susanne U. et al. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. **Elife**, v. 9, p. e51243, 2020.

FULGHUM, Bryan; TANKER, Sophie H.; WHITE III, Richard Allen. DeGenPrime provides robust primer design and optimization unlocking the biosphere. **Bioinformatics Advances**, v. 4, n. 1, p. vbae044, 2024.

GERVAIS, Alain L.; MARQUES, Maud; GAUDREAU, Luc. PCRTiler: automated design of tiled and specific PCR primer pairs. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_2, p. W308-W312, 2010.

GONZALEZ-GARCIA, Laura Natalia et al. Genetic diversity and comparative genomics across *Leishmania* (Viannia) species. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 925, 2025.

GONZALEZ-DE LA FUENTE, S., Peiró-Pastor, R., Rastrojo, A. et al. Resequenciamento do genoma de *Leishmania infantum* (cepa JPCM5) e montagem de novo em 36 contigs. **Sci Rep** 7, 18050. 2017.

GONÇALVES, S.C.;, et al. Aplicação do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de mamíferos para controle de qualidade de amostras em PCR multiplex para diagnóstico de

leishmaniose. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 2, p. 188-197, 2012.

GONG, Ping et al. Design and validation of universal and taxon-specific 16S rRNA qPCR primers for detection of freshwater harmful algal bloom-forming cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, p. 107146, 2025.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRITTI, T., et al Combination of Cpb-Hsp70 typing methods reveals genetic divergence between *Leishmania infantum* strains causing human tegumentary leishmaniasis in northern Italy and central Spain: a retrospective study. **Infectious Diseases of Poverty**, 14, 41. 2025.

HABER, Giovanna Zandonadi et al. Specificity of Primers and Probes for Molecular Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Dogs and Wild Animals. **Pathogens**, v. 14, n. 10, p. 1065, 2025.

HASSAN, Sk Sarif et al. A mathematical genomics perspective on the moonlighting role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 148045, 2025.

HEID, Christian A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HIDE M, Bañuls AL. Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. **Acta Trop.** 2006;100(3):241-245. doi:10.1016/j.actatropica.2006.10.012

HUANG, Ke et al. Exploring the impact of primer–template mismatches on PCR performance of DNA polymerases varying in proofreading activity. **Genes**, v. 15, n. 2, p. 215, 2024.

IOUROV, I.Y., Vorsanova, S.G. & Yurov, Y.B. Chromosomal mosaicism goes global. **Mol Cytogenet** 1, 26 2008. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-1-2>.

JACKSON, Peter R. et al. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 33, n. 5, p. 808-819, 1984.

JESUS-SANTOS, Flávio Henrique et al. LPG2 gene duplication in *Leishmania infantum*: a case for CRISPR-Cas9 gene editing. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 408, 2020.

KALANTARI, Mohsen et al. Rare detection of dermal *Leishmania infantum* in two pediatric patients with cutaneous Leishmaniasis (CL) in southern Iran. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 30, p. e00452, 2025.

KALENDAR, Ruslan et al. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. **Genes, genomes and genomics**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2009.

KALENDAR, Ruslan; LEE, David; SCHULMAN, Alan H. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. In: **DNA cloning and assembly methods**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 271-302.

KALENDAR, R. et al. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**. 2017.

KALENDAR, Ruslan et al. In silico PCR tools for a fast primer, probe, and advanced searching. In: **PCR: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 1-31.

KALENDAR, Ruslan. A guide to using FASTPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide analysis. In: **PCR Primer Design**. New York, NY: Springer US, 2021. p. 223-243.

KALENDAR, Ruslan et al. Designing allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 9, p. 773956, 2022.

KALENDAR, Ruslan et al. In silico PCR analysis: A comprehensive bioinformatics tool for enhancing nucleic acid amplification assays. **Frontiers in bioinformatics**, v. 4, p. 1464197, 2024.

KAWAGOE, Eric Kazuo et al. **Genômica comparativa de isolados de Leishmania infantum de Santa Catarina e Rio Grande do Norte**. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/231108>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

KAZEMI, B. et al. Genomic organization of Leishmania species. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

KIM, Hyerin et al. MRPrimer: a MapReduce-based method for the thorough design of valid and ranked primers for PCR. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 20, p. e130-e130, 2015.

KIRILENKO, Bogdan M. et al. Integrating gene annotation with orthology inference at scale. **Science**, v. 380, n. 6643, p. eabn3107, 2023.

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**. 2018;145(5):585-594. doi:10.1017/S0031182017002013.

KORESSAAR, Triinu; REMM, Mado. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289-1291, 2007.

KOYUN, H., & ÜSTÜN, M. F. Bioinformatic Comparisons of Some Web-based PCR Primer Design Programs. **Hayvan Bilimi Ve Ürünleri Dergisi**, 7(2), 134-144. 2024. <https://doi.org/10.51970/jasp.1596993>.

KRALIK, Petr; RICCHI, Matteo. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 108, 2017.

KREITMANN, Louis et al. Next-generation molecular diagnostics: Leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 160, p. 116963, 2023.

KUZNETSOV, Dmitry et al. OrthoDB v11: annotation of orthologs in the widest sampling of organismal diversity. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D445-D451, 2023.

KWOK, ea S. et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 4, p. 999-1005, 1990.

LAFFITTE, Marie-Claude N. et al. Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, v. 5, p. 2350, 2016.

LANGSCHIED, Felix et al. Quest for orthologs in the era of biodiversity genomics. **Genome biology and evolution**, v. 16, n. 10, p. evae224, 2024.

LAWRIE, Jonathon M. et al. Identification of pathogenic Leishmania promastigotes by DNA: DNA hybridization with kinetoplast DNA cloned into E. coli plasmids. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 2, p. 257-265, 1985.

LI, JiaXuan et al. UPrimer: A Clade-Specific Primer Design Program Based on Nested-PCR Strategy and Its Applications in Amplicon Capture Phylogenomics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 40, n. 11, p. msad230, 2023.

LOSADA-BARRAGÁN M, Cavalcanti A, Umaña-Pérez A, et al. Detection and quantification of Leishmania infantum in naturally and experimentally infected animal samples. **Vet Parasitol.** 2016;226:57-64. doi:10.1016/j.vetpar.2016.05.022.

LOPES-LUZ, Leonardo et al. Thermodynamic Determinants in Antibody-Free Nucleic Acid Lateral Flow Assays (AF-NALFA): Lessons from Molecular Detection of Listeria monocytogenes, Mycobacterium leprae and Leishmania amazonensis. **Biomolecules**, v. 15, n. 10, p. 1404, 2025.

LUKEŠ, Julius et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MALDONADO-ARONI, M, et al. Validação de PCR em Tempo Real para Diagnóstico de Espécies de Leishmania Utilizando o Gene Hsp20. **Tropa. Med. Infectar.** Dis. 2025, 10, 121. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10050121>.

MANESH, Reza Mohammadi et al. Detection and Identification of Leishmania major, Leishmania tropica, and Leishmania infantum in Clinical Samples Based on Size Polymorphism of Partially Amplified Ribosomal DNA. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. aop, 2025.

MARTÍ-CARRERAS, J, et al. Identification of Leishmania infantum Epidemiology, Drug Resistance and Pathogenicity Biomarkers with Nanopore Sequencing. **Microorganisms** 2022, 10, 2256. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112256>.

MARY C, FARAUT F, LASCOMBE L, DUMON H. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol.** 2004;42(11):5249-5255. doi:10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004.

MCNAIR, James N. et al. The theoretical basis of qPCR and ddPCR copy number estimates: A critical review and exposition. **Water**, v. 17, n. 3, p. 381, 2025.

MACLEAN, A. R.; GUNSON, R. Automation and standardisation of a quantitative multiplex PCR assay using PCR. Ai. **Journal of Virological Methods**, v. 329, p. 114981, 2024.

MEAGHER, Robert J. et al. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. **Analyst**, v. 143, n. 8, p. 1924-1933, 2018.

MOREIRA, Otacilio C et al. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta tropica** vol. 184 (2018): 29-37. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.020.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Leishmaniose canina: atualização sobre epidemiologia, diagnóstico, tratamento e prevenção. **Vet. Sci.** 2022, 9, 387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>.

MORENO J, et al. Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. **Vaccine**. 2007 Jul 20;25(29):5290-300.

MORINHA, Francisco; MAGALHÃES, Paula; BLANCO, Guillermo. Standard guidelines for the publication of telomere qPCR results in evolutionary ecology. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 3, p. 635-648, 2020.

NCBI. Leishmania infantum JPCM5 genome assembly (ASM287v2). National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002875.2/. Acesso em: 18 dez. 2025.

NEGREIRA, Gabriel H. et al. High throughput single-cell genome sequencing gives insights into the generation and evolution of mosaic aneuploidy in Leishmania donovani. **Nucleic acids research**, v. 50, n. 1, p. 293-305, 2022.

NEGREIRA, Gabriel H. et al. The adaptive roles of aneuploidy and polyclonality in Leishmania in response to environmental stress. **EMBO reports**, v. 24, n. 9, p. e57413, 2023.

O'HALLORAN, Damien M. PrimerMapper: high throughput primer design and graphical assembly for PCR and SNP detection. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 20631, 2016.

OLÍAS-MOLERO, Ana Isabel et al. Early antibody response and clinical outcome in experimental canine leishmaniasis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 18606, 2019.

ORTEGA, María Victoria et al. Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify Leishmania infantum DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. **Veterinary parasitology**, v. 243, p. 92-99, 2017.

OSHAGHI, Mohammad A. et al. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for L. infantum/L. donovani discrimination. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 61-65, 2009.

OWCZARZY, Richard et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W163-W169, 2008.

PAREYN, M., Alves, F., Burza, S. et al. Leishmaniose. **Nat Rev Dis Primers** 11, 81, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00663-w>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

PATINO, Luz H. et al. Revisiting the heterogeneous global genomic population structure of Leishmania infantum. **Microbial genomics**, v. 7, n. 9, p. 000640, 2021.

PEACOCK CS, et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nature genetics**. 2007 Jul;39(7):839-47.

PENNISI, Maria-Grazia et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 302, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>.

PITSCH, Jonathan W. et al. CREPE (CREate Primers and Evaluate): a computational tool for large-scale primer design and specificity analysis. **Genes**, v. 16, n. 9, p. 1062, 2025.

PRASANNA, Pragya; UPADHYAY, Arun. Heat shock proteins as the druggable targets in leishmaniasis: promises and perils. **Infection and immunity**, v. 89, n. 2, p. 10.1128/iai. 00559-20, 2021.

PRUDHOMME, Jorian et al. Performance evaluation of nine reference centers and comparison of DNA extraction protocols for effective surveillance of Leishmania-infected Phlebotomine sand flies: Basis for technical recommendations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 12, p. e0012543, 2024.

QU, Wubin et al. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W205-W208, 2012.

RAVEL, C. et al. High conservation of the fine-scale organisation of chromosome 5 between two pathogenic Leishmania species. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 12, p. 2473-2477, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/27.12.2473>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

RAMPAZZO, RCP; SOLCÀ, MS; SANTOS, LCS; et al. Um qPCR duplex pronto para uso para detectar DNA de Leishmania infantum em cães naturalmente infectados. **Parasitologia Veterinária**, v. 246, p. 100-107, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.009>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

REY-LADINO, Jose A. et al. Leishmania major: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 Gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. **Experimental parasitology**, v. 85, n. 3, p. 249-263, 1997.

ROCA-GERONÈS, X, et al. Genetic Variability in Leishmaniasis-Causing Leishmania infantum in Humans and Dogs from North-East Spain. **Animals** 2024, 14, 1796. Disponível em <https://doi.org/10.3390/ani14121796>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

RODICIO, Rosaura; SCHMITZ, Hans-Peter; HEINISCH, Jürgen J. Genetic and physiological characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the crabtree-negative yeast Kluyveromyces lactis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 2, p. 772, 2022.

ROGERS, Matthew B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. **Genome research**, v. 21, n. 12, p. 2129-2142, 2011.

ROMÃO, Susana et al. The cytosolic trypanothione of Leishmania infantum is essential for parasite survival. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 6, p. 703-711, 2009.

RODRIGUES-LUIZ, Gabriela F. et al. TipMT: Identification of PCR-based taxon-specific markers. **BMC bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 104, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1485-3>. Acesso em 02 de janeiro de 2026.

ROZEN, Steve; SKALETSKY, Helen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Bioinformatics methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana press, 2000. p. 365-386.

RUIZ-VILLALBA, Adrián et al. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). **Biomolecular detection and quantification**, v. 14, p. 7-18, 2017.

SALEEM, Talha; CHAUDHARY, Shafiq Ahmad; SHAUKAT, Iqra. Primer Optimization for SNP Based PCR And Quantitative Real Time PCR Assays. **Biomedical Current Insights**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2025.

SAMSAMI, Sahar et al. A Novel Multiplex LAMP Assay for the Rapid and Accurate Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* from Iran. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2023, n. 1, p. 9326183, 2023.

SANTOS, Maria Luiza dos. Análise genômico comparativa de *Leishmania Infantum*: implicações da aneuploidia em mosaico na resistência a fármacos. 2025.

SCHWABL, Philipp et al. Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 139, 2021. DOI: 10.1038/s42003-021-01658-5.

SEGATTO, Marcela et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 39-47, 2012.

SILVEIRA, Fernando Tobias et al. Comparative genomic analyses of new and old world viscerotropic leishmanine parasites: further insights into the origins of visceral leishmaniasis agents. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 25, 2022.

SIREKBASAN, Serhat; OSMAN, Samatar Samaleh; GÜRKÖK-TAN, Tuğba. Genomic Insights into the Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Gene Family in *Leishmania major* and *Leishmania infantum*: Expression Patterns and Potential Association with Drug Resistance. **Diagnostics**, v. 15, n. 11, p. 1433, 2025.

SOLANA, Jose Carlos et al. Assembly of a large collection of maxicircle sequences and their usefulness for *Leishmania* taxonomy and strain typing. **Genes**, v. 13, n. 6, p. 1070, 2022.

SO, Ken Ying Kin et al. Pitfalls during in silico prediction of primer specificity for eDNA surveillance. **Ecosphere**, v. 11, n. 7, p. e03193, 2020.

STEVENS, Mckayla et al. HSP60/10 chaperonin systems are inhibited by a variety of approved drugs, natural products, and known bioactive molecules. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 29, n. 9, p. 1106-1112, 2019.

STADHOUDERS, Ralph et al. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 1, p. 109-117, 2010.

SHANMUGASUNDRAM, Achchuthan et al. TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011058, 2023.

TATTON, W. G. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. **Advances in Research on Neurodegeneration**, p. 77-100, 2000.

TAYLOR, Sean C. et al. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761-774, 2019.

TEIXEIRA, D. G. et al. Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 10-11, p. 655-665, 2017.

- TEIXEIRA, Santuza M. et al. Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 1-17, 2012.
- TEGENFELDT, Fredrik et al. OrthoDB and BUSCO update: annotation of orthologs with wider sampling of genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D516-D522, 2025.
- TOLEDO, Antonio et al. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 257-264, 2002.
- TRAJANO-SILVA, Lays Adrienne Mendonça et al. Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: a sample quality control approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 03, p. 350-357, 2017.
- TRAVI, Bruno L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.
- TRIGO, Beatriz Batista et al. In silico and in vitro evaluation of primers for molecular differentiation of *Leishmania* species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e022020, 2021.
- UBEDA, Jean-Michel et al. Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite *Leishmania*. **PLoS biology**, v. 12, n. 5, p. e1001868, 2014.
- UNTERGASSER, Andreas et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.
- VAN WEEZEP, E, et al. PCR diagnostics: In silico validation by an automated tool using freely available software programs. **Journal of Virological Methods**, v. 270, p. 106-112, 2019.
- VRIES, Henry JC; REEDIJK, Sophia H.; SCHALLIG, Henk DFH. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015..
- WATZINGER, Franz; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 254-298, 2006.
- WARD, Brian M.; MONTICELLI, Stephanie R. A Quantitative Real-Time PCR Assay for Measuring Poxvirus Replication and Cell Binding. In: **Vaccinia, Mpox, and Other Poxviruses: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2024. p. 27-37.
- WANG, Kun et al. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W610-W613, 2019.
- WINCKER, Patrick et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 9, p. 1688-1694, 1996.
- WU, Yun et al. Establish an allele-specific real-time PCR for *Leishmania* species identification. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 11, n. 1, p. 60, 2022.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics** 13, 134 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

YOU, Frank M. et al. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 253, 2008.

ZEMANOVA, Eva et al. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 6, p. 613-617, 2015.

ZHANG, Li et al. Novel structures of type 1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* provide new insights into the mechanism of generation of 1, 3-bisphosphoglyceric acid. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1565, 2021.

ZHAO, Fangzhou et al. An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. **Horticulture Research**, v. 8, 2021.

ZOU, Yaowei et al. Facile and Ultrafast Microfluidic Photothermal PCR for Autonomous and Quantitative Point-of-Care Pathogen Detection. **Small**, v. 21, n. 12, p. 2411417, 2025.