



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE DA VIDA E DA  
NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS**

**DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO QUALITATIVO POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

**EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS**

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA  
VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS**

**DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO QUALITATIVO POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

**EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2024

EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS

**DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO QUALITATIVO POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências, do Instituto Latino-americano de Ciências da Vida e Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr(a). Kelvinson Fernandes Viana  
Orientador(a)  
UNILA

---

Dr(a). Flávio Luiz Tavares  
Examinador(a)  
UNILA

---

Dr(a). Henrique Gama Ker  
Examinador(a)  
UFOP

Foz do Iguaçu, Estado de Paraná, 09 de fevereiro de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

B242

Barcellos, Ema Carolina Almeida.

Desenvolvimento do ensaio qualitativo por Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina / Ema Carolina Almeida Barcellos. - Foz do Iguaçu, 2024. 59 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu – PR, 2024, Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Diagnóstico. 3. LAMP (Reação Isotérmica Mediada por Loop). 4. Zoonose. 5. Protozoário. I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Título.

CDU 616-074:616.993.161

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Kelvinson Fernandes Viana, pela orientação durante este trabalho.

Aos professores que compuseram a banca, agradeço pelas preciosas orientações e contribuições.

Aos meus colegas e amigos da graduação em Biotecnologia, agradeço pelo apoio mútuo e pela partilha de conhecimentos, tornando esta jornada acadêmica ainda mais significativa.

À minha família, expresso meu reconhecimento pela constante presença e apoio ao longo dessa árdua jornada. Sua dedicação e encorajamento foram fundamentais para minha trajetória acadêmica. A todos, meu sincero agradecimento por fazerem parte deste importante capítulo da minha vida.

*"Conhecer a si mesmo é o começo de toda a sabedoria."*

Aristóteles

BARCELLOS, Ema Carolina Almeida. **Desenvolvimento do ensaio qualitativo por Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**. Orientadores: VIANA, Kelvinson Fernandes (orientador). 59 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu, 2024.

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose transmitida através da picada de flebotomíneos infectados pelo protozoário do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae e representa uma preocupação significativa para a saúde pública em áreas endêmicas. Este estudo teve como objetivo desenvolver um ensaio qualitativo para a detecção de Leishmaniose Visceral Canina por meio da *reação isotérmica mediada por loop* (LAMP). Considerando amostras de sangue de 53 cães sintomáticos, o ensaio foi padronizado utilizando um protocolo pré-estabelecido e comparado com a técnica molecular padrão ouro (qPCR). Durante o processo de padronização, identificaram-se desafios relacionados à reprodutibilidade, fenômeno amplamente documentado na literatura científica, estes desafios foram enfrentados através da implementação de práticas laboratoriais apropriadas. Apesar dos desafios, os resultados destacam o potencial do método LAMP como uma abordagem eficaz e precisa para o diagnóstico de cães sintomáticos, contribuindo para o controle da Leishmaniose Visceral Canina e prevenção da transmissão zoonótica. A análise revelou que o método LAMP evidenciou uma sensibilidade de 100% (IC 95%) e especificidade de 100% (IC 95%) para amostras de sangue. A análise da Curva ROC reforçou a capacidade do LAMP em distinguir entre cães com Leishmaniose Visceral Canina e controles saudáveis, consolidando sua eficácia como uma ferramenta diagnóstica confiável.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral Canina; diagnóstico; LAMP (Reação Isotérmica Mediada por Loop); zoonose; protozoário.

BARCELLOS, Ema Carolina Almeida. **Desarrollo del ensayo cualitativo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para diagnosticar la leishmaniasis visceral canina**. Asesores: VIANA, Kelvinson Fernandes (asesor). 59 h.. *Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado em Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu, 2024.*

## **RESUMEN**

*La Leishmaniasis Visceral Canina (LVC) es una zoonosis transmitida a través de la picadura de flebotomos infectados por el protozoo del género Leishmania de la familia Trypanosomatidae y representa una importante preocupación para la salud pública en zonas endémicas. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar un ensayo cualitativo para la detección de la leishmaniasis visceral canina mediante la reacción isotérmica mediada por bucle (LAMP). Considerando muestras de sangre de 53 perros sintomáticos, el ensayo se estandarizó utilizando un protocolo preestablecido y se comparó con la técnica molecular estándar de oro (qPCR). Durante el proceso de estandarización, se identificaron desafíos relacionados con la reproducibilidad, un fenómeno ampliamente documentado en la literatura científica. Estos desafíos se enfrentaron mediante la implementación de prácticas de laboratorio adecuadas. A pesar de los desafíos, los resultados resaltan el potencial del método LAMP como un enfoque eficaz y preciso para diagnosticar perros sintomáticos, lo que contribuye al control de la leishmaniasis visceral canina y a la prevención de la transmisión zoonótica. El análisis reveló que el método LAMP tenía una sensibilidad del 100% (IC del 95%) y una especificidad del 100% (IC del 95%) para las muestras de sangre. El análisis de la curva ROC reforzó la capacidad de LAMP para distinguir entre perros con leishmaniasis visceral canina y controles sanos, consolidando su eficacia como una herramienta de diagnóstico fiable.*

**Palabras clave:** *Leishmaniasis visceral canina; diagnóstico; LAMP (Reacción Isotérmica Mediada por Bucle); zoonosis; protozoos.*



BARCELLOS, Ema Carolina Almeida. ***Development of a qualitative loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosing canine visceral leishmaniasis.*** Advisors: VIANA, Kelvinson Fernandes (advisor). 59 s.. *Dissertation (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu, 2024.*

## **ABSTRACT**

*Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a zoonosis transmitted through the bite of sandflies infected by the protozoan of the genus Leishmania of the Trypanosomatidae family and represents a significant concern for public health in endemic areas. This study aimed to develop a qualitative assay for the detection of Canine Visceral Leishmaniasis through the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. Blood samples from 53 symptomatic dogs were considered for the assay, which was standardized using a pre-established protocol and compared with the gold standard molecular technique (qPCR). During the standardization process, challenges related to reproducibility were identified, a phenomenon widely documented in the scientific literature. These challenges were addressed through the implementation of appropriate laboratory practices. Despite the challenges, the results highlight the potential of the LAMP method as an effective and accurate approach for diagnosing symptomatic dogs, contributing to the control of Canine Visceral Leishmaniasis and the prevention of zoonotic transmission. The analysis revealed that the LAMP method had a sensitivity of 100% (95% CI) and 100% specificity (95% CI) for blood samples. The ROC Curve analysis reinforced the ability of LAMP to distinguish between dogs with Canine Visceral Leishmaniasis and healthy controls, consolidating its effectiveness as a reliable diagnostic tool.*

**Keywords:** *Canine Visceral Leishmaniasis; diagnosis, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Reaction); zoonosis; protozoan.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de casos de Leishmaniose Visceral ocorridos entre o ano de 2006 até o ano de 2016 em países subdesenvolvidos.....	16
<b>Figura 2.</b> Ciclo de Vida de <i>Leishmania spp</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do funcionamento dos primers da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP).....	22
<b>Figura 4.</b> Parâmetros utilizados na PCR convencional de <i>L. infantum</i> .....	27
<b>Figura 5.</b> Metodologia do ensaio LAMP para Leishmaniose Visceral Canina.....	29
<b>Figura 6.</b> Produtos da PCR convencional observados na eletroforese em gel de agarose .....	32
<b>Figura 7.</b> Eletroforese de LAMP (agarose a 2%) para as amostras de DNA de cultura de <i>L. Infantu</i> .....	33
<b>Figura 8.</b> Resultados da LAMP utilizadas no diagnóstico de LVC.....	34
<b>Figura 9.</b> Eletroforese para avaliação da especificidade dos primers no ensaio LAMP....	35
<b>Figura 10.</b> Análise da curva ROC para a LAMP em amostras de sangue.....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Comparação percentual entre amostras de Sangue nos testes LAMP e qPCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	38
---	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Amostras utilizadas no presente estudo.....	56
<b>Quadro 2.</b> Preços dos equipamentos e reagentes da PCR convencional.....	58
<b>Quadro 3.</b> Preços dos equipamentos e reagentes da LAMP.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Primers que foram utilizados na PCR convencional.....	26
<b>Tabela 2.</b> Conjuntos de primers usados para amplificação de genes do kDNA no ensaio LAMP para <i>L. infantum</i> .....	26
<b>Tabela 3.</b> Sensibilidade e Especificidade da Técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) na detecção de <i>Leishmania infantum</i> .....	36
<b>Tabela 4.</b> Variação entre o número de amostras para cada tipo de tecido no ensaio LAMP e qPCR.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B3	<i>Backward 3 Primer</i>
Bip	<i>Backward Inner Primer</i>
BST	Bacillus Stearothermophilus
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNTP	Trifosfato de Desoxinucleotídeo
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EXO	Exonuclease
FIP	<i>Forward Inner Primer</i>
KDNA	Cinetoplasto de <i>Leishmania</i>
<i>LAMP</i>	Reação Isotérmica Mediada por Loop
LVA	Forma Zoonótica
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVZ	Forma Antroponótica
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Referencial teórico.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Imunopatologia.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Microscopia.....	19
1.3.2 Imunoensaios.....	19
1.3.3 Diagnóstico molecular.....	20
1.3.4 Reação isotérmica mediada por loop (LAMP).....	20
<b>1.4 Justificativa.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Pergunta norteadora de hipótese.....</b>	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Caracterização das amostras.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Cultivo dos parasitos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Primers LAMP e PCR.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Extração do material genético.....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Extração e quantificação.....	26
3.4.2 Limite de detecção.....	27
3.4.3 Validação e especificidade dos primers através da PCR Convencional.....	27
3.4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	27
<b>3.5 Reação isotérmica mediada por Loop.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Testes de validação e especificidade dos primers LAMP.....</b>	<b>29</b>

<b>3.7 Ensaio padronizado.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8 Análise de dados.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9 Considerações éticas.....</b>	<b>30</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Otimização da padronização LAMP para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Validação dos controles positivos da Reação.....</b>	<b>31</b>
4.2.1 Validação do protocolo de otimização do ensaio LAMP.....	32
<b>4.3 Ensaio padronizado.....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Ensaio especificidade dos primers.....	34
4.3.2 Limite de detecção.....	35
<b>4.4 Sensibilidade e especificidade e valores preditivos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Análise de curva ROC.....</b>	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>45</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo A – Amostras utilizadas no presente estudo.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo B – Equipamentos e reagentes da PCR convencional.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo C – Equipamentos e reagentes da LAMP.....</b>	<b>59</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença negligenciada provocada por protozoários da espécie *Leishmania infantum* (*L. Infantum*). A transmissão dessa zoonose ocorre por meio da picada de um vetor do subgênero *Phlebotomus*, conhecido como "mosquito-palha" e que carrega o parasito em seu organismo. Essa enfermidade pode afetar seres humanos e outros animais, predominando nos órgãos internos, manifestando-se como uma condição sistêmica. Quando não tratada adequadamente, a Leishmaniose Visceral Canina pode resultar em complicações, como feridas na pele e perda de pêlos e podendo levar o animal até mesmo ao óbito.

Os métodos diagnósticos mais convencionais para identificar a Leishmaniose Visceral Canina incluem imunoenaios, microscopia e testes moleculares. No entanto, essas abordagens apresentam limitações, sendo geralmente mais dispendiosas devido aos equipamentos e reagentes utilizados, além de demandarem tempo. Métodos diagnósticos mais ágeis, com elevada sensibilidade e especificidade, têm o potencial de aprimorar a conduta médica, permitindo tratamentos mais precisos. Essa técnica é conduzida a uma única temperatura, e sua interpretação ocorre por meio da mudança instantânea na coloração ou turbidez do meio, facilitando sua aplicação em condições de campo.

Assim, a LAMP assume relevância significativa no diagnóstico de doenças endêmicas no Brasil, como a Leishmaniose Visceral Canina. Até o momento, não há kits de diagnóstico molecular baseados em LAMP registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso veterinário no país. O que existe são estudos em fase de desenvolvimento em universidades (*in house*), carecendo de uma padronização efetiva (MAPA, 2022).

### 1.1 Referencial teórico

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos principalmente pela picada de flebotomíneos, também conhecidos como "mosquitos-palha" (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Essas enfermidades têm uma distribuição geográfica abrangente e afetam tanto seres humanos quanto animais, constituindo um desafio significativo para a saúde pública em várias regiões do mundo (JAIN; JAIN., 2015).

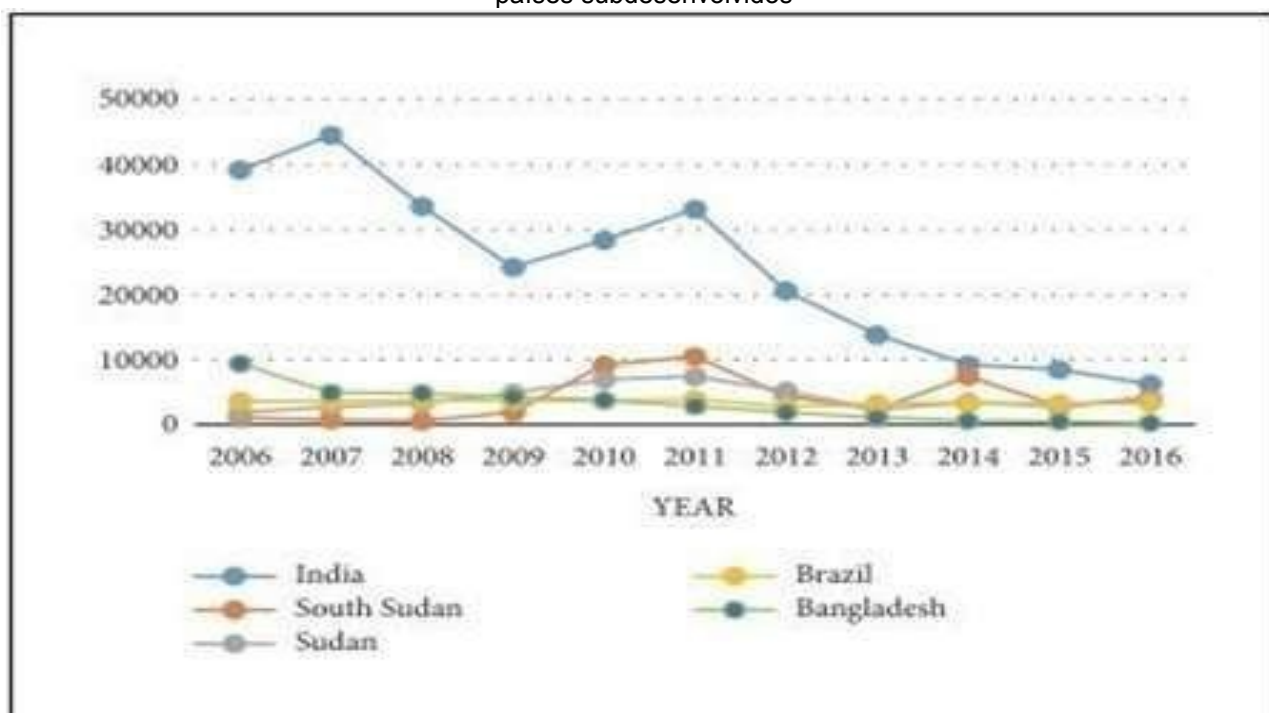
As diversas formas clínicas incluem a leishmaniose cutânea, que se caracteriza por

úlceras na pele, e a leishmaniose mucocutânea, que pode envolver as mucosas do nariz, boca e garganta (MASOUDZADEH *et al.*, 2020). A Leishmaniose Visceral, a variante mais grave, atinge órgãos internos como fígado, baço e medula óssea, podendo ser fatal se não tratada de maneira adequada (VAN GRIENSVEN; DIRO., 2019).

A leishmaniose cutânea (tegumentar), dependendo da espécie e da região e pode evoluir para lesões cutâneas difusas (*L. amazonensis*), recidivas (*L. tropica*) ou leishmaniose mucocutânea (*L. braziliensis*). A Leishmaniose Visceral (calazar), é causada por *L. donovani*, eventualmente pode se disseminar para a derme ocasionando a Leishmaniose Pós-Calazar (BURZA *et al.*, 2019). A leishmaniose também pode ser classificada quanto às espécies susceptíveis: a forma zoonótica (LVZ) que é transmitida para animais e a forma antroponótica (LVA) que é transmitida entre humanos (BI *et al.*, 2018).

Esta doença negligenciada atinge principalmente os países que sofrem com a falta de saneamento básico. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma estimativa de que ocorram entre 200 a 400 mil novos casos da doença ao ano, sendo que 90% destes casos afetam países subdesenvolvidos, dentre eles o Brasil (DE RUITER *et al.*, 2014) como podemos observar na (Figura 1). O primeiro caso de leishmaniose visceral Canina ocorreu na cidade brasileira de Foz do Iguaçu no ano de 2015 e foi identificado por meio de ferramentas moleculares (DIAS *et al.*, 2019).

**Figura 1.** Número de casos de Leishmaniose Visceral ocorridos entre o ano de 2006 até o ano de 2016 em países subdesenvolvidos

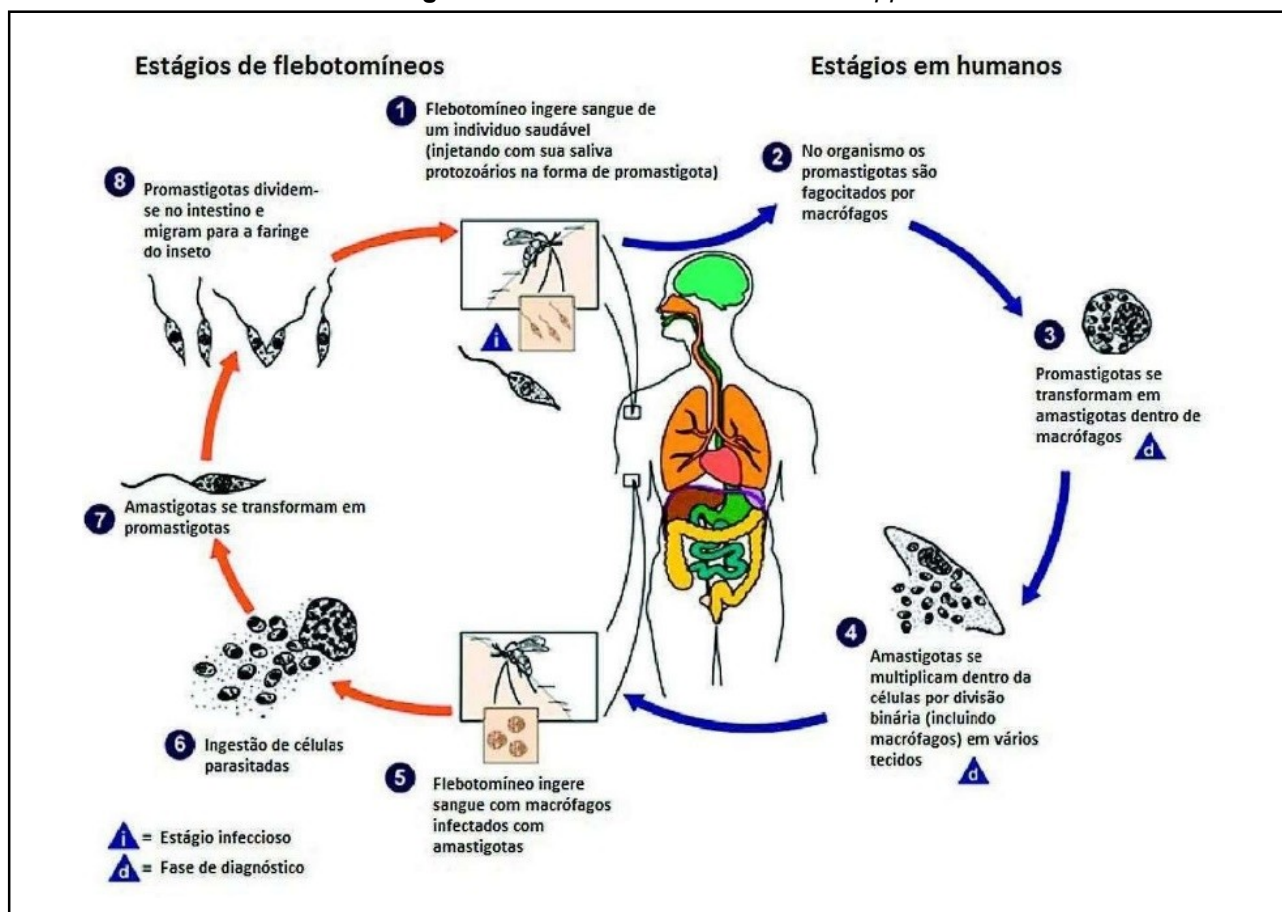


Fonte: Bi *et al.*, 2018.

Os sintomas mais comuns observados no aspecto clínico são febre, palidez, fraqueza, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia (JAIN; JAIN. 2015). O diagnóstico preciso e específico é de suma importância pois, dessa forma é possível definir um tratamento direcionado. A Leishmaniose Visceral Canina ainda não tem cura, entretanto, existem no mercado tratamentos com medicamentos e imunoterápicos.

Após a inoculação na pele ocorre a infecção sistêmica. Existem duas formas evolutivas do parasito, a promastigota flagelada e a amastigota (CLOS *et al.*, 2022), ambas necessárias para completar um ciclo de vida do parasito , como mostra o esquema abaixo (Figura 2).

**Figura 2.** Ciclo de Vida de *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado de Jain & Jain, 2015.

O ciclo de vida da *L. infantum*, agente causador da Leishmaniose Visceral, compreende uma sequência de eventos entre o vetor (flebotomíneo) e o hospedeiro vertebrado (humano). Inicia-se quando o flebotomíneo infectado com formas promastigotas ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado contamina-se com

o parasita. No interior do vetor, essas formas se desenvolvem em formas amastigotas e depois em promastigotas novamente, tornando-se infectantes para o próximo hospedeiro. Ao picar um novo hospedeiro, o flebotomíneo inocula as formas promastigotas, que são fagocitadas por células do sistema imunológico, transformando-se em amastigotas. As amastigotas se reproduzem nas células hospedeiras e podem disseminar-se para diversos órgãos. Se um flebótomo picar um hospedeiro infectado, ingere as formas amastigotas, reiniciando o ciclo. Essa complexa interação destaca as adaptações do parasita para sobreviver nos ambientes distintos do vetor e do hospedeiro, desempenhando um papel crucial na transmissão da Leishmaniose Visceral (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

## 1.2 Imunopatologia

Os parasitas causadores das Leishmanioses são transmitidos por meio de picadas de flebotomíneos infectados, estabelecendo-se nos macrófagos do hospedeiro e causando infecção ao evadir as defesas imunológicas. Essas células têm a capacidade de apresentar os parasitas aos linfócitos T CD4+ (T-helper) e CD8+ (citotóxicos)(VIANA *et al.*, 2019). Os macrófagos ativados tornam-se refúgios seguros para o crescimento do parasita, porém, contraditoriamente também desempenham papel na destruição por meio da liberação de IFN- $\gamma$  e intermediários tóxicos como o ácido nítrico (JAIN; JAIN., 2015).

A interação da *Leishmania* com o sistema imunológico é crucial para compreender a patogênese da doença. De acordo com De Abreu e colaboradores (2023), essa afinidade explica a frequente infecção da medula óssea e dos linfonodos. A infecção por *Leishmania* se caracteriza por respostas imunes do tipo Th1 e supressão das respostas Th2, evidenciada pela redução de IL-4 e IL-10 (OSTOLIN *et al.*, 2022). A gravidade da infecção leishmaniose é influenciada pela espécie causadora e pela resposta imunológica. A mediação das respostas imunológicas pelos Receptores Toll-Like (TLRs) regula a resposta inata a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). TLR4 e TLR9 desempenham papel crucial na resposta imune contra *Leishmania* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Ambos os órgãos são ricos em macrófagos, células responsáveis pela fagocitose e eliminação de patógenos. Em última análise, a compreensão desses mecanismos de disseminação da *Leishmania* e de sua interação complexa com os órgãos do sistema imunológico é essencial para a compreensão da complexidade clínica dessa doença

(JAIN; JAIN., 2015).

### **1.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**

A leishmaniose é comumente detectada por microscopia, imunoenaios e técnicas moleculares. As amostras mais utilizadas são: sangue, swab do conjuntivo e mucosa oral ou do focinho, medula óssea e aspirados do baço (VAN GRIENSVEN; DIRO., 2019). Apesar de serem ferramentas úteis para a identificação da *Leishmania*, a maioria dos testes apresentam limitações (THAKUR *et al.*, 2020).

#### **1.3.1 Microscopia**

O critério de referência para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral consiste principalmente na análise microscópica de culturas. Apesar da notável especificidade desses métodos, a sensibilidade varia conforme o tipo de amostra, situando-se aproximadamente entre 93% e 99% para o baço, 53% a 86% para a medula óssea e 53% a 65% para os linfonodos (RUITER *et al.*, 2014). Adicionalmente, a eficácia dos testes parasitológicos também está sujeita à habilidade do técnico em interpretá-las.

#### **1.3.2 Imunoensaio**

Os testes sorológicos baseados em anticorpos mais utilizados para identificação da Leishmaniose Visceral Canina são, principalmente : reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imun absorção enzimática (ELISA). A técnica ELISA apresenta diversas variações mas, de maneira geral, ocorre a reação entre uma enzima e o seu substrato ligado ao anticorpo, fazendo com que um cromógeno mude de cor. Esta técnica é capaz de detectar antígenos ou anticorpos específicos para a *L. infantum*. A sensibilidade e especificidade da técnica é alta, podendo chegar a 100%. No ensaio de Silva e colaboradores (2016), a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) apresentou sensibilidade de 99% e uma especificidade aproximada de 85% para Leishmaniose Visceral Canina. A principal desvantagem destes testes é avaliar se um tratamento está sendo efetivo, visto que a titulação de anticorpos é alta e permanecem muito tempo após o desaparecimento dos sintomas. Além disso, nestes testes é comum ocorrerem reações cruzadas com outros parasitas que também infectam cães (DE

RUITER *et al.*, 2014).

### **1.3.3 Diagnóstico molecular**

As técnicas moleculares utilizam em grande parte o DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA), a literatura também aponta outros alvos que são utilizados como a glicoproteína-63-18S do rRNA (SALARI *et al.*, 2022). Neste contexto, o gene K26, amplamente utilizado para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, sendo específico para *L. infantum* (BARBOSA *et al.*, 2016). Devido a sua especificidade o gene K26 foi selecionado para a escolha dos *primers* deste projeto (LI, Hao *et al.*, 2019).

A especificidade dos testes moleculares geralmente é alta (95 a 100%) devido a utilização de *primers* altamente específicos. A desvantagem da utilização da PCR para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina é o preço dos equipamentos e reagentes onerosos, além da técnica demandar a necessidade de uma estrutura laboratorial (DE LIMA CELESTE *et al.*, 2019). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) apresenta uma sensibilidade mais alta que a reação da cadeia da polimerase (PCR) convencional e por isso é considerada o método molecular mais confiável (FREIRE *et al.*, 2017).

No Brasil não há kits comerciais de LAMP para diagnóstico molecular canino registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O MAPA é o órgão responsável pela aprovação para a produção e comercialização de kits de diagnóstico para uso veterinário, de acordo com a Instrução normativa nº 4, de 19 de fevereiro de 2008 (MAPA, 2022).

### **1.3.4 Reação isotérmica mediada por loop (LAMP)**

De acordo com Ribeiro e colaboradores (2021), a Reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) teve sua origem no Japão em 1998, sendo desenvolvida pela empresa Eiken Chemical Company e foi posteriormente descrita por Notomi e colaboradores (2000). A principal enzima envolvida no processo LAMP é a DNA polimerase Bst (*Bacillus stearothermophilus*), responsável pela extensão das fitas do DNA alvo. Essa enzima, que possui resistência ao calor, possibilita a amplificação isotérmica em temperaturas constantes e possui a propriedade singular de deslocamento de fita em comparação a outras polimerases que não a possuem (YAN *et al.*, 2014).

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) difere da reação em cadeia da polimerase (PCR) tradicional, pois não requer helicase nem primase. Ela foi projetada para operar em condições isotérmicas, a LAMP realiza a amplificação do DNA em temperatura constante, eliminando a necessidade de ciclos térmicos e equipamentos onerosos (MUKHTAR *et al.*, 2018). Enzimas adicionais, como a exonuclease (Exo) podem ser empregadas para otimizar a reação em diferentes variações do LAMP (GHASEMIAN *et al.*, 2014).

A introdução de dNTP pela polimerase resulta na produção de pirofosfato e íons de hidrogênio, ocasionando uma transição do pH inicial básico para um ambiente ácido e também torna a reação mais turva devido ao acúmulo desse pirofosfato (ZEN *et al.*, 2022). A Betaína é um aditivo muito utilizado no mix de LAMP e desempenha um papel crucial ao estabilizar a estrutura da dupla hélice do DNA, especialmente em temperaturas elevadas, minimizando a formação de estruturas secundárias indesejadas, aumentando a especificidade da reação e reduzindo amplificações inespecíficas e reações cruzadas, elementos fundamentais para obter resultados precisos em diagnósticos (VERMA *et al.*, 2013).

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) requer um componente fundamental denominado "primers". Diferentemente da reação em cadeia da polimerase (PCR), a LAMP necessita de pelo menos quatro primers para sua realização, podendo ser utilizados primers adicionais, comumente entre 4 a 6 (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Estes primers demandam parâmetros específicos, como a temperatura de melting, a quantidade de pares de bases CG e a formação de estruturas de Hairpin. A interação desses primers com o DNA ocorre de maneira distinta da PCR (GIRARDON *et al.*, 2016), conforme esquematizado na (Figura 3).

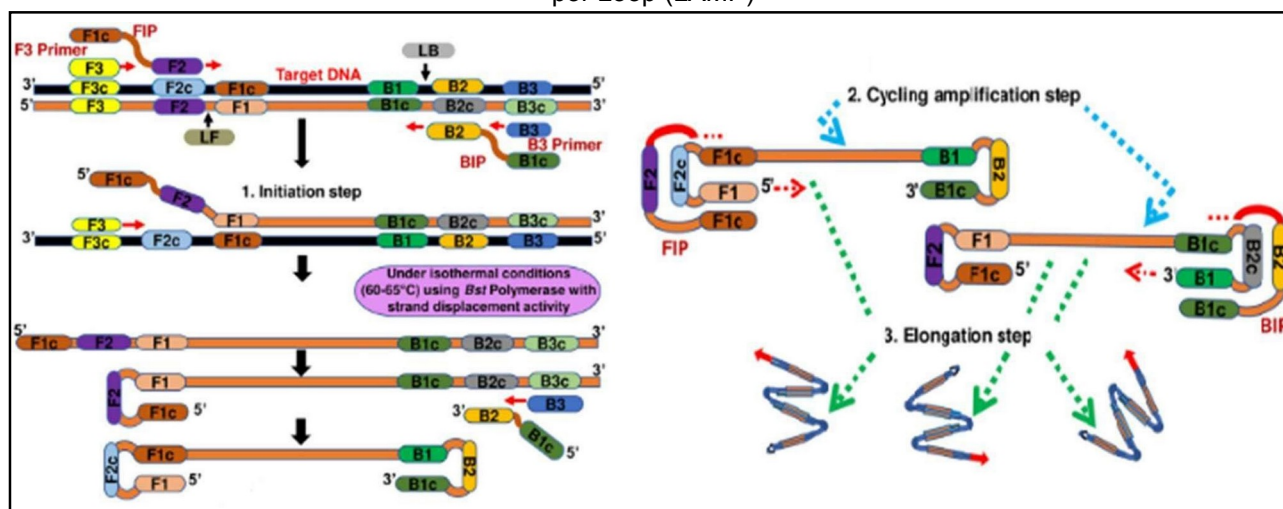
Os quatro primers principais, denominados CORE, compreendem o *Forward Inner Primer* (FIP) e o *Backward Inner Primer* (BIP), que são primers internos, e o *Forward 3 Primer* (F3) e o *Backward 3 Primer* (B3) (ABBASI *et al.*, 2016), capazes de ligar-se a regiões específicas do DNA, sendo cada um complementar a uma região da fita alvo.

Inicia-se o processo quando o primer interno *Forward* liga-se à sua sequência complementar e a Bst polimerase inicia a síntese da nova fita. Simultaneamente, o primer externo conecta-se a montante do primer interno, a Bst Polimerase sintetiza uma nova fita, liberando-a da fita molde (DE LIMA CELESTE *et al.*, 2019).

Essa fita recém-sintetizada forma um loop devido à auto complementaridade da extremidade da fita, repetindo-se o processo com os primers internos e externos

Backward até a formação de uma estrutura em formato de haltere. Os primers internos, então, se ligam aos loops presentes nos halteres, gerando novas sequências de DNA (VERMA *et al.*, 2013).

**Figura 3.** Representação esquemática do funcionamento dos primers da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP)



Fonte: Nzelu, 2019.

#### 1.4 Justificativa

A maioria dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis para a detecção da Leishmaniose Visceral Canina, embora possuam elevada sensibilidade e/ou especificidade, apresentam desafios, como o tempo demandado, custos elevados e propensão a reações cruzadas, resultando em falsos positivos. Nesse cenário, destaca-se a vantagem do diagnóstico baseado na reação isotérmica mediada por Loop (LAMP) por sua rapidez, precisão e custo acessível, visando possibilitar o tratamento precoce para a recuperação dos animais infectados.

Essa abordagem diagnóstica dispensa a necessidade de uma infraestrutura laboratorial extensa, o que é especialmente relevante para o enfrentamento de uma doença endêmica na região, como é o caso de Foz do Iguaçu. A cidade, situada em uma região de fronteira com significativo fluxo populacional e que apresenta um elevado índice de infecção causada pelo parasita. Portanto, o desenvolvimento dessa metodologia assume importância crucial para a saúde pública em Foz do Iguaçu.

Os resultados deste estudo almejam contribuir para embasar futuros programas de controle da Leishmaniose Visceral Canina, direcionar estratégias de tratamento e promover a qualidade de vida dos animais. Ressalta-se que o presente projeto é



financiado pelo programa Bolsa Técnico da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA).

### **1.5 Pergunta norteadora de hipótese**

A técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por loop (LAMP) demonstra sensibilidade, especificidade no diagnóstico da *Leishmaniose Visceral Canina*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver um teste capaz de detectar a presença de *L. infantum* doravante a técnica reação isotérmica mediada por loop (LAMP) em amostras de sangue de cães infectados.

### 2.2 Específicos

- padronizar a Reação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP);
- avaliar a especificidade e a sensibilidade da técnica de LAMP qualitativa para diagnóstico da *Leishmaniose Visceral Canina* com amostras clínicas de sangue provenientes de cães naturalmente infectados por *L. infantum*; e
- comparar os resultados da LAMP e da qPCR.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização das amostras

Foram avaliadas amostras de cultura de *L. Infantum* (utilizadas como controles positivos e nos ensaios de validação) de 53 amostras de sangue obtidas do laboratório DEVAX® localizado na cidade de Foz do Iguaçu (Anexo A e Quadro 1).

Todas as amostras de sangue foram previamente testadas por qPCR (laboratório terceirizado), onde destas 15 foram confirmadas como verdadeiramente positivas e 38 como verdadeiramente negativas. As 53 amostras de sangue (verdadeiras positivas e verdadeiras negativas na qPCR) também foram submetidas aos exames ELISA e RIFI.

As cepas de *Leishmania* selecionadas foram MHOM/BR/1972/BH46 de *L. infantum*, MHOM/BR/1989/Ba199 de *L. amazonensis* e MHOM/BR/75/M2904 de *L. braziliensis*, as quais foram empregadas como controle positivo do controle positivo para amostras de sangue.

#### 3.2 Cultivo dos parasitos

Os protozoários foram cultivados em meio *Drosophila schneider* suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibiótico (pH 7.4) e foram centrifugados a 6.000 rpm para obtenção dos pellets. Em seguida, foram ressuspensos em tampão de fosfato salino (PBS) e quantificados em câmara de Neubauer (VIANA, 2012). As amostras de sangue foram coletadas com tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Foi atribuído um número interno aos cães para garantir o sigilo, e todas as amostras foram acondicionadas em freezer a -80°C.

#### 3.3 Primers LAMP e PCR

Foram utilizados um conjunto de primers LAMP a partir da sequência do gene K-26 presente no cinetoplasto de *Leishmania infantum* e um par de primers de PCR convencional para *L. infantum* (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Primers que foram utilizados na PCR convencional

<b>Espécie</b>	<b>Primer</b>	<b>Referência</b>
<i>F3 L. infantum</i>	GTGGGGGAGGGGCGTTCT	AZAMI-CONESA, Iris <i>et al.</i> , 2021
<i>B3 L. infantum</i>	ATTTTACACCAACCCCCAGTT	AZAMI-CONESA, Iris <i>et al.</i> , 2022

**Fonte:** da autora, 2024.

**Tabela 2.** Conjuntos de primers usados para amplificação de genes do kDNA no ensaio LAMP para *L. infantum*

<b>Espécie</b>	<b>Primer</b>	<b>Referência</b>
<i>FIP L. infantum</i>	CCACGTTGTGTCCATCTTCGTCTAAGGAGGAT GA GAATCTGC	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019
<i>BIP L. infantum</i>	CGGCAATGAGGATGGTAACGATGACGCAGTG CA CTAGTTG	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019
<i>F3 L. infantum</i>	GACGGCCGTACACAGAAA	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019
<i>B3 L. infantum</i>	GGTTCACATGCGAGGATG	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019
<i>FLP L. infantum</i>	TCTTCTCCTGCGCATTCC	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019
<i>BLP L. infantum</i>	GATCAGCCGAAGGAGCAG	AVELAR, Daniel <i>et al.</i> , 2019

**Fonte:** da autora, 2024.

### 3.4 Extração do material genético

#### 3.4.1 Extração e quantificação

A extração do material genético foi realizada com dois kits de extração: *Miniprep Plus Quick-DNA™* e kit de extração *Biogene™*, ambos utilizam coluna de sílica para o procedimento. A extração utilizou o protocolo direcionado para fluidos pois as amostras utilizadas foram: sangue e culturas de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*). Os pellets das culturas de *Leishmania* spp. foram previamente ressuspensos em tampão fosfato salino (PBS). Foram utilizados 200µl de cada amostra e a extração foi realizada conforme a descrição do protocolo dos fabricantes dos Kits. A quantificação do DNA foi realizada utilizando o *Nanodrop One™* (*Thermofisher®*) nas absorvâncias 260/280 e 260/230 para avaliar a presença de contaminantes no DNA.

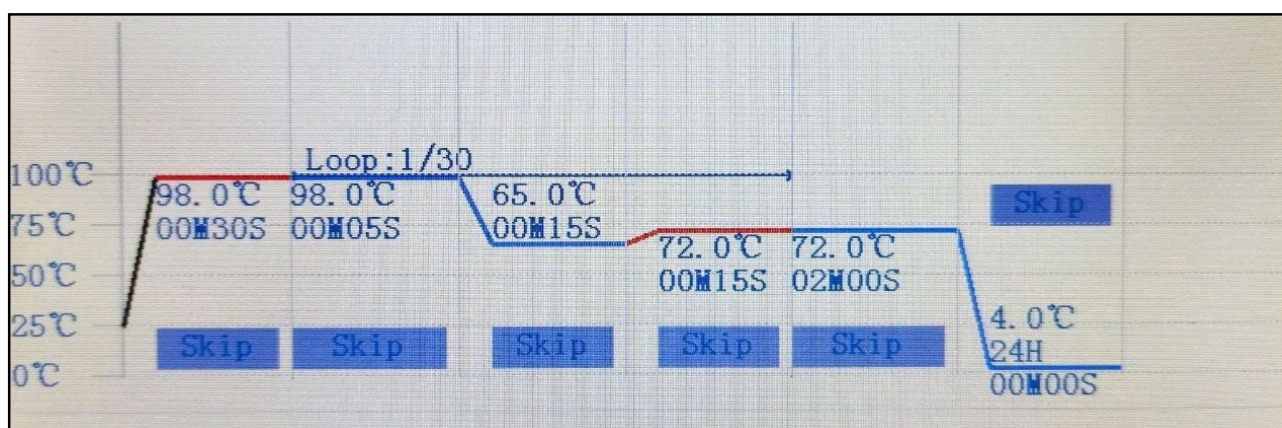
### 3.4.2 Limite de detecção

Para determinação do Limite de detecção do ensaio LAMP foi utilizado diluições de *L. infantum* entre  $10^7$  e  $10^1$  parasitos/ml em Tampão de Fosfato Salino Tamponada (PBS). A água MilliQ foi utilizada como controle negativo.

### 3.4.3 Validação e especificidade dos primers através da PCR Convencional

A reação da PCR convencional foi constituída de: 12,5µl de *Taq 2X Master Mix* (New England Biolabs®), 1,25µl de cada *primer* (10mM), 9µl de água, foi adicionado 1µl de DNA molde (aproximadamente 10 ng) miliQ, totalizando 25µl de mix. As condições estabelecidas no termociclador (Figura 4) foram: 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de 98°C por 5 segundos seguidos por 65°C por 15 segundos, 72°C por 15s, para a extensão final foi realizado 1 ciclo a 72°C por 2 minutos e 4°C durante 24 horas. O equipamento utilizado foi o termociclador *T960 Touch EVEN*® (GHASEMIAN *et al.*, 2014; REIS, 2013) (Anexo B e Quadro 2).

Figura 4. Parâmetros utilizados na PCR convencional de *L. infantum*



Fonte: da autora, 2024.

### 3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, 5 µL do produto da PCR foi ressuspendido em tampão da amostra (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25% e 15% de ficoll) e aplicados em gel de agarose 1,2% (AZAMI-CONESA *et al.*, 2021) e a 2% para a LAMP (SHARMA *et al.*, 2020) e corados com Gelred. A corrida foi realizada em tampão TAE 0,5X (Tris-

Acetato-EDTA) em uma cuba eletroforética durante 30 minutos a 100V. Foi utilizado como marcador de peso molecular (*Ludwig Biotec 1 Kpb DNA Ladder*). Após a corrida, o gel foi levado para o transiluminador (LOCCUS<sup>®</sup> LHC 13X15) e o padrão de bandas analisado.

### 3.5 Reação isotérmica mediada por Loop

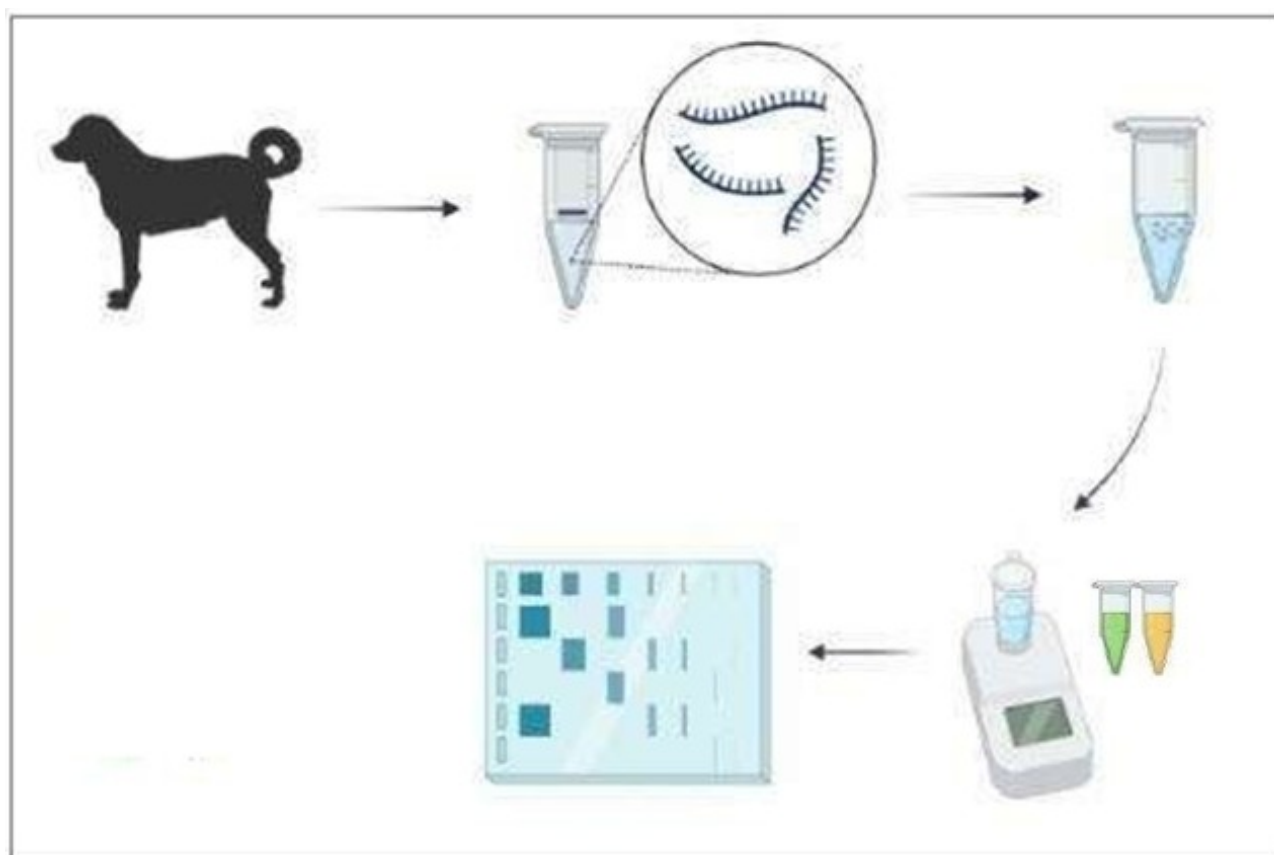
Foi realizado um ensaio piloto antes de padronizar o protocolo no qual utilizou-se primers criados pelo software Primer Explorer V5 utilizando o gene K-26, sendo utilizado o Core. Entretanto as tentativas utilizando diversos parâmetros não obtiveram sucesso, portanto optamos por seguir utilizando um protocolo pré-estabelecido, modificando algumas variáveis e reagentes.

A reação de LAMP foi composta por tampão 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.8), 8 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,0 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTP), 8 unidades de Bst Polymerase Turbo 2.0 (Cellco<sup>®</sup>), 40 pmol de cada primer FIP e BIP, 5 pmol de cada iniciador F3 e B3, 20 pmol de cada FLP e BLP, e 3 µl de amostra de DNA, totalizando 25 µl por reação. O eppendorf foi incubado a 65°C por 30 minutos e, em seguida, aquecido a 90°C por 2 minutos para encerrar a reação.

Após o período de incubação, realizou-se a detecção colorimétrica usando 3µl de SYBR Green<sup>®</sup> diluídos na proporção de 1:10 e adicionados à tampa do microtubo. Ao final da reação, a mistura foi manualmente agitada para evidenciar o resultado do teste diagnóstico. Resultados positivos para *L. infantum* foram identificados pela coloração verde, enquanto os negativos permaneceram na cor laranja (DIXIT *et al.*, 2018).

O esquema acima (Figura 5) ilustra a metodologia do projeto: realizou-se a extração do DNA das amostras clínicas. Posteriormente, implementou-se a reação LAMP, compreendendo a preparação de um mix de reagentes, seguido pela utilização de um termobloco, mantendo a reação a temperatura constante. Subsequentemente, para validar os resultados dessa reação, introduziu-se um corante revelador no teste. A etapa final consistiu na realização da eletroforese em gel de agarose a 2%. Este procedimento foi executado para validação dos resultados obtidos.

**Figura 5.** Metodologia do ensaio LAMP para Leishmaniose Visceral Canina



Fonte: da autora, 2024.

### 3.6 Testes de validação e especificidade dos primers LAMP

O ensaio de especificidade compreendeu testes de reação cruzada e especificidade dos primers de PCR direcionados a *Leishmania infantum* e outras duas espécies, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Essa avaliação foi realizada por meio da técnica de PCR convencional utilizando DNA extraído da cultura de *L. infantum*. A validação das amostras de DNA foi conduzida mediante PCR convencional, seguida por eletroforese em gel de agarose (seção 3.3.4). Essa metodologia foi aplicada às amostras de sangue afim de garantir a precisão e confiabilidade dos resultados (Anexo C e Quadro 3).

### 3.7 Ensaio padronizado

Neste estudo, realizamos a padronização da técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) para posteriormente ser utilizada no diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina. Nesse contexto, foram selecionadas como controles

positivas amostras de cultura de *L. infantum* devidamente avaliadas por meio da PCR convencional. Paralelamente, amostras constituídas apenas por água foram utilizadas como controles negativos durante as reações de amplificação mediadas *por loop* (LAMP).

A padronização do ensaio LAMP utilizou os primers e protocolo estabelecido por AVELAR e colaboradores (2019) com algumas alterações, incluindo a utilização de reagentes de marcas distintas, tais como dNTPs, tampão e Bst polimerase. Além disso, o tempo final de reação foi ajustado para otimizar a eficiência do processo e a forma de utilização do SYBR Green foi modificada para minimizar contaminações (SUKPHATTANAUDOMCHOKE *et al.*, 2020).

A otimização do protocolo foi realizada visando garantir não apenas a reprodutibilidade dos resultados, mas também adequar o procedimento à disponibilidade prática dos insumos e confere uma perspectiva prática e aplicável às nuances específicas do contexto experimental.

### **3.8 Análise de dados**

As Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) foram utilizadas como método de avaliação da acurácia diagnóstica dos testes realizados no presente estudo. Essas curvas, amplamente aplicadas em análises diagnósticas, oferecem uma representação gráfica da relação entre sensibilidade e especificidade (HUANG *et al.*, 2018).

No âmbito estatístico, a significância baseou-se no valor de  $p < 0,001$  contribuindo para a validação dos resultados provenientes das análises das Curvas ROC (DIXIT *et al.*, 2018). Essa abordagem estatística robusta fortalece a interpretação confiável e sólida da acurácia diagnóstica dos testes conduzidos nesta pesquisa.

### **3.9 Considerações éticas**

O projeto foi submetido ao Comitê de ética no uso de animais com número de protocolo 02/2021 e faz parte do Projeto Guarda-Chuva: “Bioprospecção de Imunobiológicos Destinados à Saúde Animal e Humana”. Foi realizado no laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABMIC) localizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), no município de Foz do Iguaçu.



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Otimização da padronização LAMP para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**

Nesta pesquisa, conduzimos o refinamento da reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), visando sua aplicação no diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina para amostras de sangue. A otimização da padronização da técnica foi essencial para obter melhores resultados. A manipulação de variáveis experimentais, tais como concentrações de reagentes, temperatura e tempo de reação, desempenharam um papel importante na obtenção de resultados confiáveis.

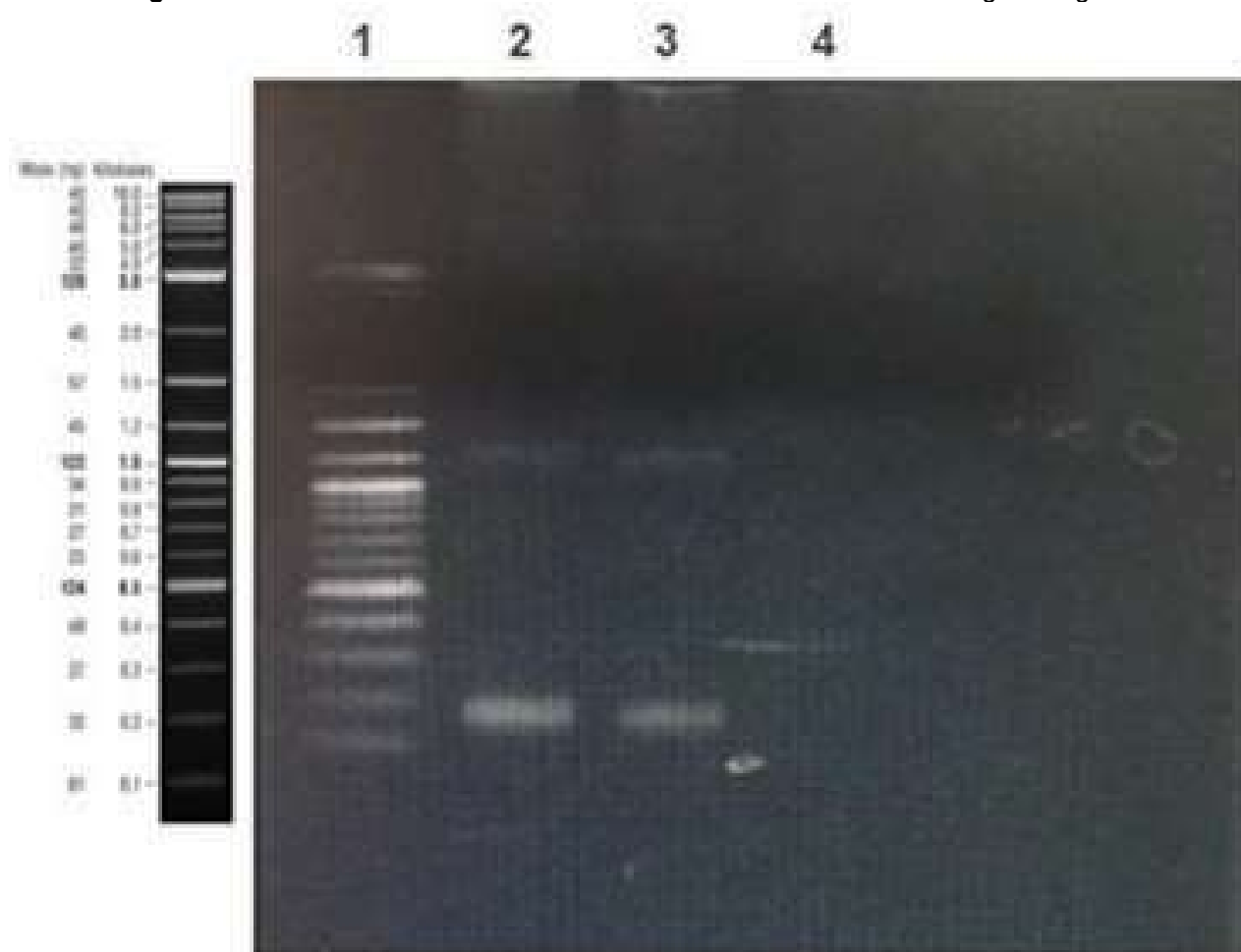
Nesse contexto, verificou-se que, a 60 graus Celsius, ocorreu uma amplificação inespecífica, elucidada pelo insucesso tanto dos controles positivos (utilizando amostras de DNA de cultura de *L. infantum*) quanto dos negativos (utilizando apenas água ultrapura livre de nuclease). Em contrapartida, ao estabelecer a temperatura de 65°C por 30 minutos, a reação desdobrou-se conforme as expectativas. Os controles positivos, utilizando amostras de DNA de cultura de *L. infantum*, mantiveram-se coerentemente positivos, enquanto os negativos, utilizando apenas água ultrapura, subsistiram com sua negatividade inalterada, proporcionando uma clara visualização do experimento.

### **4.2 Validação dos controles positivos da Reação**

A validação dos controles positivos de uma técnica molecular é essencial para confirmar que a técnica pode produzir resultados precisos e consistentes, além disso ela garante que seus resultados sejam reproduzíveis em diferentes ambientes, como observado na (Figura 6).

Na coluna 2 e 3, observa-se amostras de sangue. A coluna 4 representa o Controle Negativo (CN) da reação, utilizando apenas água. A amplificação ocorreu conforme o esperado, validando dessa forma os controles positivos utilizados no experimento. A visualização em gel de agarose forneceu informações valiosas sobre a qualidade da amplificação e foi, portanto, uma etapa fundamental na validação da técnica LAMP.

**Figura 6.** Produtos da PCR convencional observados na eletroforese em gel de agarose



Fonte: da autora, 2024.

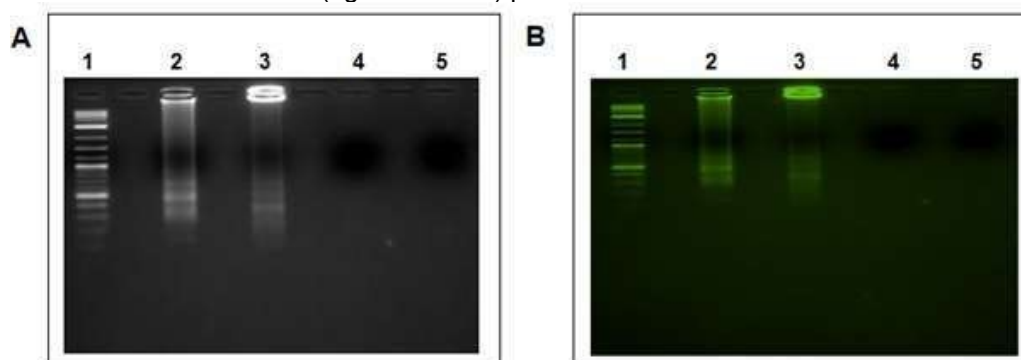
#### **4.2.1 Validação do protocolo de otimização do ensaio LAMP**

A análise do gel de agarose das amplificações da Lamp padroniza controle positivo utilizando DNA de cultura de *L. infantum* e CN utilizando água ultrapura, revelou um padrão característico do ensaio LAMP. Como evidenciado na (Figura 7), observa-se uma escada de múltiplas bandas, conforme demonstrado no estudo de Salari e colaboradores (2022). A visualização dos padrões de amplificação nas imagens A e B não apenas validaram a presença de *L. infantum*, mas também sinalizam o sucesso na otimização da técnica LAMP.

Na Imagem A, na coluna 1 encontra-se o marcador de escada de DNA de 1 Kbp (New England Biolabs®) utilizado como referência. As colunas 2-3 ilustram os controles positivos, apresentando duplicatas originárias de DNA de cultura de *L. infantum*, enquanto as colunas 4-5 representam os controles negativos, constituídos apenas por água. A imagem B exibe a mesma disposição, porém utilizando um filtro de SYBR Green para

realçar a fluorescência proveniente da amplificação.

**Figura 7.** Eletroforese de LAMP (agarose a 2%) para as amostras de DNA de cultura de *L. infantum*

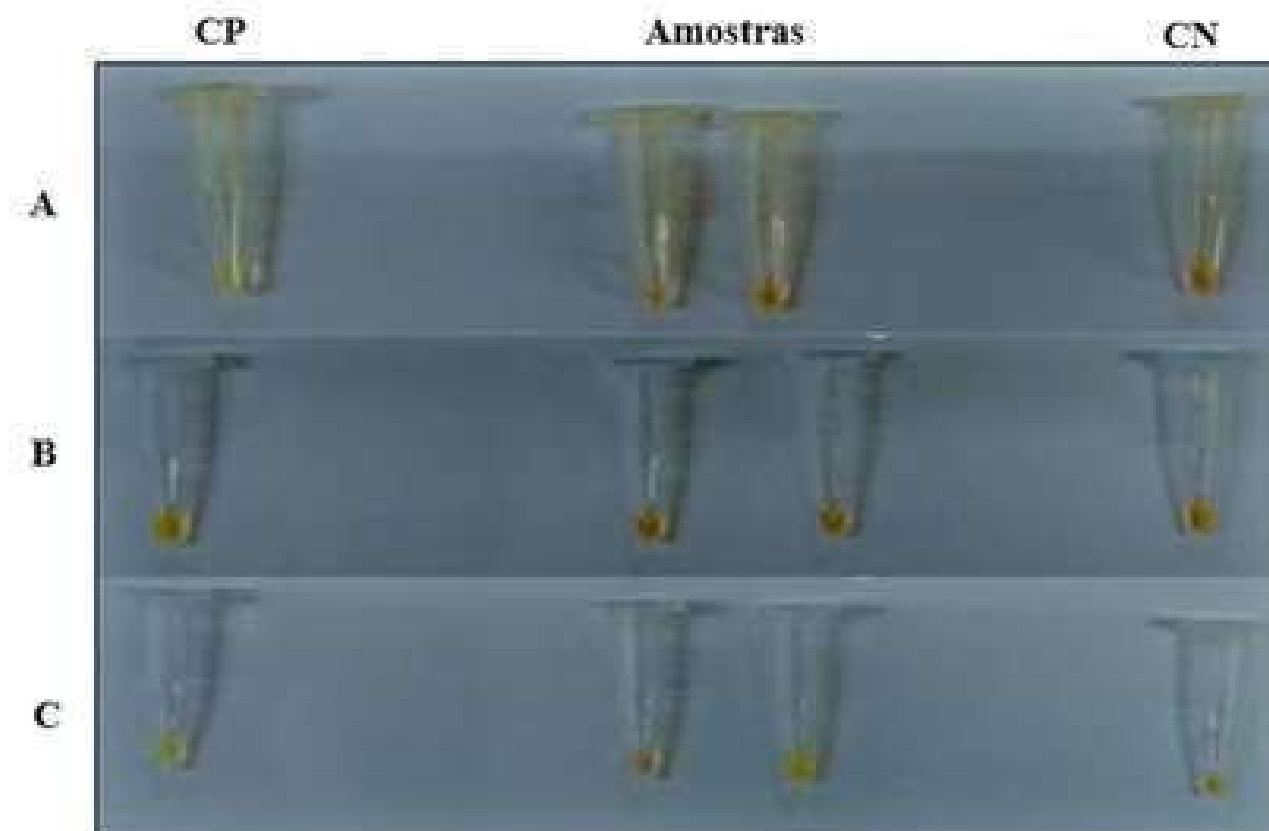


Fonte: da autora, 2024.

### 4.3 Ensaio padronizado

Após a padronização do teste, procedeu-se à realização dos ensaios de diagnóstico LAMP com os controles validados nos ensaios anteriores. Esses controles, consistentemente, incluíam um controle positivo, um controle negativo e as amostras a serem analisadas. Abaixo (Figura 8), a título de exemplificação, evidenciam-se seis amostras de sangue testadas juntamente com seus respectivos controles. No entanto, vale ressaltar que o ensaio LAMP abrangeu um total de 58 amostras testadas, sendo estas sempre comparadas a outros testes diagnósticos. Este procedimento rigoroso visou assegurar a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos, fornecendo uma avaliação abrangente da eficácia do teste em questão.

**Figura 8.** Resultados da LAMP utilizadas no diagnóstico de LVC



**Legenda:** as amostras da linha A e B representam resultados negativos (coloração alaranjada) para o ensaio LAMP, já uma das amostras da linha C apresenta positividade (coloração verde/amarelada) devida a presença do intercalante de DNA.

**Fonte:** da autora, 2024.

#### 4.3.1 Ensaio especificidade dos primers

As amostras avaliadas para o ensaio de espécie específica incluíram material de PCR convencional de diversas espécies, sendo elas: *L. infantum*, *L. brasiliensis*, e *L. amazonensis* e o Controle Negativo, utilizando apenas água. A figura 9 revela o resultado da eletroforese para o ensaio de especificidade dos primers utilizados. Cada coluna representa a amplificação obtida a partir de um primer específico para *L. infantum*, evidenciando a seletividade e a eficácia do ensaio na identificação específica do alvo de interesse.

Uma das amostras de *L. infantum* revelou uma banda de leve intensidade, entretanto sua duplicata não demonstrou amplificação. Em contrapartida, as outras espécies e o controle negativo não apresentaram nenhuma banda, corroborando a especificidade dos primers de PCR utilizados e a validação do controle positivo, constituído pela cultura de *L. infantum*.

**Figura 9.** Eletroforese para avaliação da especificidade dos primers no ensaio LAMP



**Legenda:** 1 e 1.1 *L. infantum*, 2 e 2.2 *L. brasiliensis*, 3 e 3.3 *L. amazonensis* e Controle Negativo (CN água).

**Fonte:** da autora, 2024.

#### **4.3.2 Limite de detecção**

O limite de detecção das reações de LAMP detectou até 100 picogramas (equivalente a 0,1 ng) do DNA de *Leishmania infantum*.

#### **4.4 Sensibilidade e especificidade e valores preditivos**

Foram analisadas 58 amostras que foram previamente submetidas à avaliação por meio de qPCR, considerada a técnica padrão ouro no diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Apenas amostras de sangue foram submetidas a testes imunoenzimáticos (ELISA e RIFI). Tanto a qPCR quanto a LAMP identificaram para as amostras de sangue 15 animais verdadeiramente positivos e 38 animais verdadeiramente negativos, resultando em uma sensibilidade de 100% (IC 95%) para o total de amostras. As amostras negativas tanto da LAMP como da qPCR apresentaram uma especificidade de 100% (IC 95%).

As análises estatística de sensibilidade e especificidade das amostras de sangue objetivou avaliar o desempenho diagnóstico ao realizar a comparação entre os dois testes

(LAMP e qPCR). A comparação entre diferentes técnicas diagnósticas foi essencial para avaliar a eficácia e a sensibilidade entre os métodos (Tabela 3).

A fórmula para a sensibilidade é:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiros Positivos}}{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

E a fórmula para a especificidade é:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiros Negativos}}{\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Positivos}}$$

**Tabela 3.** Sensibilidade e Especificidade da Técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) e na PCR na detecção de *L. infantum*

<b>LAMP gene k-26</b>				
<b>Resultado do teste</b>	<b>Doentes</b>	<b>Saudáveis</b>	<b>Se. % (IC 95%)</b>	<b>Sp. % (IC 95%)</b>
<b>Verdadeiros Positivos</b>	15	0	15	38
<b>Verdadeiros Negativos</b>	0	38	15/(15+0)	38/(38+0)
<b>Total</b>	15	38	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>PCR</b>				
<b>Resultado do teste</b>	<b>Doentes</b>	<b>Saudáveis</b>	<b>Se. % (IC 95%)</b>	<b>Sp. % (IC 95%)</b>
<b>Verdadeiros Positivos</b>	15	0	15	38
<b>Verdadeiros Negativos</b>	0	38	15/(15+0)	38/(38+0)
<b>Total</b>	15	38	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Fonte:** da autora, 2024.

Foram calculados os valores de prevalência, o valor de prevalência positiva e negativa, além da proporção dos positivos e negativos, no estudo em questão, para um total de 53 amostras de sangue.

A tabela 4 exibe uma representação gráfica da distribuição das amostras para as amostras de sangue em ambos os testes diagnósticos.

**Tabela 4.** Variação entre o número de amostras para cada tipo de tecido no ensaio LAMP e qPCR

<b>Teste Diagnóstico</b>	<b>LAMP</b>	<b>PCR</b>
Verdadeiros Negativos	38	38
Verdadeiros Positivos	15	15
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>53</b>

**Fonte:** da autora, 2024.

A prevalência, é a proporção de indivíduos doentes na população, levando em consideração o mesmo número de cães verdadeiros positivos e verdadeiros negativos para ambos os testes (LAMP e PCR).

A fórmula para prevalência é:

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos}}{\text{Total de amostras}}$$

Aplicando na fórmula, temos:

$$\text{Prevalência} = \frac{15+0}{53} = 0,2830 (28,30 \%)$$

O valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de que um indivíduo com teste positivo realmente esteja doente. Sua fórmula é dada por:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}}{(\text{Sensibilidade} \times \text{Prevalência}) + (1 - \text{Especificidade}) \times (1 - \text{Prevalência})}$$

Substituindo os valores de sensibilidade, especificidade e prevalência, temos:

$$\text{VPP} = \frac{1 \times 0,2830}{(1 \times 0,2830) + (1 - 1) \times (1 - 0,2830)} = \frac{0,2830}{0,2830} = 1 (100 \%)$$

O valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade de que um indivíduo com teste negativo realmente não esteja doente. Sua fórmula é dada por:

$$\text{VPN} = \frac{\text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência})}{(\text{Especificidade} \times (1 - \text{Prevalência})) + (1 - \text{Sensibilidade}) \times \text{Prevalência}}$$

Substituindo os valores, temos:

$$\text{VPN} = \frac{1 \times (1 - 0,2830)}{(1 \times (1 - 0,2830)) + (1 - 1) \times 0,2830} = \frac{0,72}{0,72} = 1 (100 \%)$$

A proporção de falsos positivos (FPF) indica a fração de indivíduos não doentes

que testam positivo. Ela é complementar ao VPP:

$$FPF = 1 - VPP$$

Como o VPP é de 100%, a FPF é de:

$$FPF = 1 - 1 = 0(0\%)$$

A proporção de falsos negativos (PFN) representa a fração de indivíduos doentes que testam negativo. Ela é complementar ao VPN:

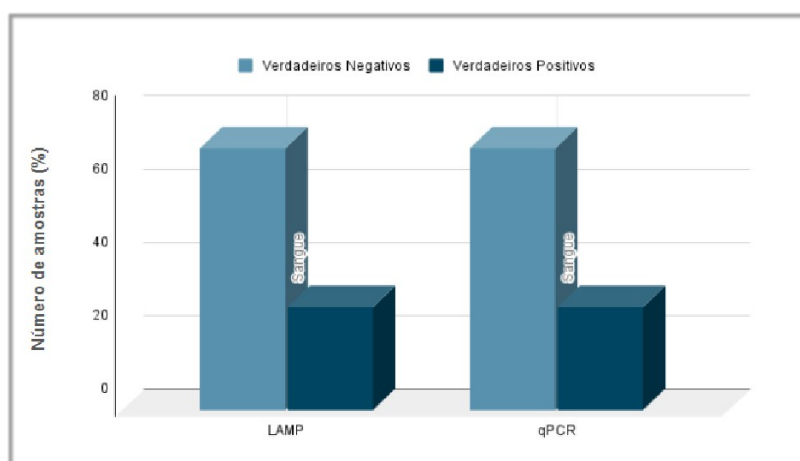
$$PFN = 1 - VPN$$

Como o VPN é de 100%, a PFN é de:

$$PFN = 1 - 1 = 0(0\%)$$

Com base nos cálculos realizados, o teste LAMP para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina apresentou sensibilidade e especificidade de 100%, resultando em valores preditivos positivo e negativo igualmente de 100%. Não foram observados falsos positivos ou falsos negativos, corroborando a elevada acurácia do teste nos parâmetros avaliados. Em análise comparativa entre os dois testes diagnósticos (LAMP e qPCR), não foi possível observar diferenças significativas para ambos os testes. O Gráfico 1 representa visualmente a distribuição das amostras e destaca as discrepâncias e semelhanças nos resultados obtidos por ambas as técnicas.

**Gráfico 1.** Comparação percentual entre amostras de Sangue nos testes LAMP e qPCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina



Fonte: da autora, 2024.

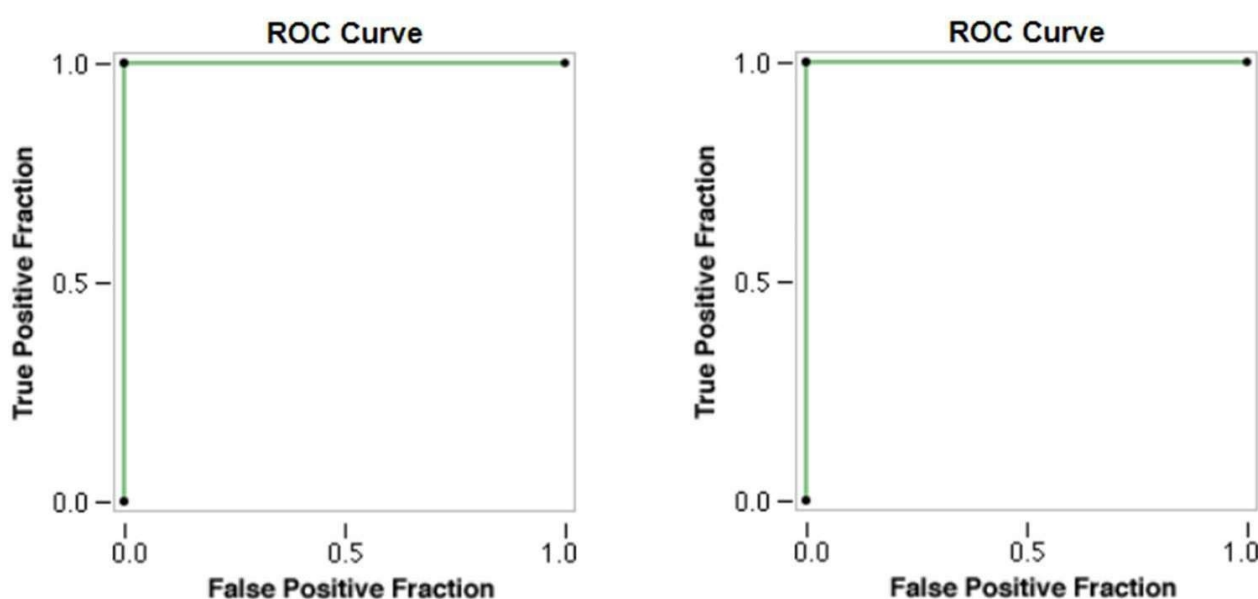


Ao examinar o tecido sanguíneo, observamos que o teste LAMP detectou positividade em 28,3% das amostras de sangue (dentro o total de 53 amostras), assim como no ensaio qPCR. Essa porcentagem mencionada não necessariamente reflete a sensibilidade do teste em relação ao tecido sanguíneo, pois as amostras analisadas dependeram da demanda e abrangiam diferentes quadros clínicos e distintas cargas parasitárias. Portanto, a porcentagem positiva observada pode ser influenciada por essa diversidade clínica.

#### 4.5 Análise de curva ROC

Foi gerada a curva ROC para avaliar a acurácia dos testes diagnósticos LAMP e PCR para o grupo de 53 amostras de sangue. Para tanto utilizou-se o programa estatístico JROCFIT disponível em <http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html> específico para gerar imagens de curva ROC, capaz de comportar dados discretos e contínuos. A análise da curva ROC para as amostras de sangue no intervalo de confiança (IC) de 95% atingiu a mesma área sob a curva (AUC) de 1,0 (Figura 10) tanto para o teste LAMP, quanto para o ensaio da PCR.

**Figura 10.** Análise da curva ROC para a LAMP e PCR em amostras de sangue



Fonte: da autora, 2024.

## 5 DISCUSSÃO

A implementação da técnica LAMP, embora promissora, enfrenta os mesmos desafios em diversos estudos publicados para a detecção de diferentes doenças (MELLO *et al.*, 2022; LACERDA *et al.*, 2021; GHASEMIAN *et al.*, 2014) não sendo achados exclusivos deste trabalho, como a influência da quantidade de primer na formação de auto-dímeros e o excesso de tempo no termociclador que implicam em ampliações inespecíficas. Durante a padronização do experimento, na qual foram utilizadas diversas variáveis em diferentes concentrações, evidenciou-se que concentrações elevadas de reagentes como a betaína e MgSO<sub>4</sub> prejudicaram a atividade enzimática, culminando em potenciais resultados falsos positivos. Por outro lado, concentrações mais baixas desse componente proporcionaram as condições ideais para a eficácia da reação, demonstrando a sensibilidade da enzima a variações na composição do meio reacional.

A complexidade na concepção dos primers se deve ao comprimento dos primers internos e a quantidade elevada de primers específicos utilizados na técnica (6 primers), mas que são necessários para garantir a especificidade do ensaio e o tempo de reação pode implicar na formação de dímeros de primers (MEAGHER *et al.*, 2018; SAHOO *et al.*, 2016), por isso foi realizada a aferição de um gradiente de tempo e assim encontramos o que melhor se aplicou a técnica.

Na determinação do tamanho e da sequência dos primers é importante determinar a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dentro da faixa de temperatura adequada (entre 60°C e 65°C), considerada ótima para a atividade da maioria das Bst DNA polimerases, como demonstrado por TAKAHASHI *et al.* (2014). Segundo Ribeiro *et al.* (2021), ao analisar o padrão de bandas da eletroforese de LAMP, é necessário analisar se ela se assemelha a um esfregaço ou a um padrão de múltiplas bandas, pois esta pode indicar uma reação inespecífica. A contaminação através da dispersão de aerossóis do produto da amplificação da LAMP é uma etapa de controle muito importante para evitar a contaminação sistêmica. Neste trabalho o corante foi adicionado na tampa do tubo e a reação foi revelada por mistura manual, evitando dessa forma resultados falsos-positivos, recomendamos portanto que o tubo permaneça fechado até o final da reação.

Caso seja inevitável a abertura do tubo para outros ensaios, como a execução do gel de eletroforese, é necessário conduzir essa etapa em uma sala isolada daquela onde a reação foi originalmente realizada, como foi demonstrado no trabalho de MOEHLING *et al.* (2021). Durante a execução da técnica, a contaminação ambiental foi reconhecida

como um fator de extrema relevância. Assim, a utilização de um conjunto distinto de pipetas e luvas foi adotada para garantir práticas de higiene adequadas, além disso, a eficácia na prevenção de contaminações foi aprimorada por meio da limpeza de bancadas e materiais utilizando hipoclorito, enfatizando a necessidade de adotar precauções rigorosas.

A validação dos resultados da técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) em gel de agarose representou uma etapa indispensável no processo de garantia da confiabilidade diagnóstica. Este procedimento compreendeu uma análise dos padrões de bandas de DNA gerados durante a amplificação, visando confirmar a presença do fragmento genético específico em questão. No ensaio de validação dos controles positivos da reação LAMP, a Identificação da *L. infantum* no produto de PCR em gel de agarose foi observada e confirmado por meio do padrão de bandas característico, com um produto amplificado entre 150 a 300 pares de base de acordo com DA SILVA *et al.* (2015). Esse padrão valida a presença de *L. infantum* demonstrando o sucesso na otimização da técnica LAMP.

Na análise de reações cruzadas destacou-se a capacidade do ensaio LAMP em discriminar entre as diferentes espécies alvo, reforçando sua utilidade como uma ferramenta de alta especificidade na detecção e identificação de *L. infantum*. A falta da banda na replicata pode ter ocorrido devido a problemas no preparo dos reagentes, descalibragem das pipetas ou até mesmo problemas no poço do equipamento termociclador. O limite de detecção do teste foi avaliado mas, se comparado a outros trabalhos, apresentou-se muito baixo. Gao e colaboradores (2015) obtiveram um limite de detecção (para isolado de cultura de *L. infantum* e outras espécies de *Leishmania*) de 1 fg de DNA. Eles também mostraram que essa quantidade ínfima de DNA é 10 vezes mais sensível que a capacidade de detecção da PCR.

A sensibilidade e especificidade do ensaio LAMP foram semelhantes às encontradas em outros trabalhos envolvendo a mesma técnica. Ghasemi e colaboradores (2014) também realizaram o diagnóstico de *L. infantum*, para um número de 47 amostras revelou resultados semelhantes aos encontrados no presente projeto. O mesmo tipo de diagnóstico conduzida no Iran, em uma região altamente endêmica para Leishmaniose Visceral, também utilizando primers do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* e amostras de sangue de pacientes humanos, evidenciou uma sensibilidade de 93,6% e uma especificidade de 100% (obtidos de 44 dos 47 casos confirmados por DAT e PCR convencional). Como tanto a sensibilidade quanto a especificidade foram de 100%, o VPP

e o VPN são 1.0 para todas as prevalências, isso indica que, independentemente da prevalência da doença, o teste LAMP é completamente preciso, sem erros de falso positivo ou falso negativo (GUIMARÃES, 1985; COHEN *et al.*, 2016).

Enquanto que no sudeste da Colômbia, Adams e colaboradores (2018) avaliaram a sensibilidade da técnica para amostras de sangue de pacientes humanos suspeitos para Leishmaniose Visceral (para o gene 18S do rDNA) e obtiveram a sensibilidade de 92% e especificidade de 100% no sangue total (IC 95%), ambos em concordância com outros trabalhos, como o de Verma *et al.* (2017). Estes achados reforçam que sensibilidade e especificidade obtidas nesta pesquisa envolvendo o diagnóstico da Leishmaniose Canina apresentaram resultados promissores. Vale ressaltar que cães contaminados pela Leishmaniose Visceral também podem transmitir a doença para os seres humanos e, portanto, os resultados desta pesquisa contribuem para o entendimento da relação entre a infecção passada entre essas duas espécies.

Foi utilizada uma quantidade reduzida de amostras devido à natureza invasiva da coleta e aos custos associados ao procedimento e a autorização do tutor do animal como é indicado no trabalho de KANOMATA (2022). Um estudo realizado por Khan e colaboradores (2021), teve por objetivo correlacionar a carga parasitária com a quantidade DNA de *L. donovani* em um contexto específico com potencial na aplicação desse ensaio para um monitoramento mais preciso dos níveis de parasitas em pacientes humanos, cada qual com distintas manifestações clínicas. Eles calcularam a equivalência de 1 parasita a 100 fentogramas, através de um método quantitativo com a finalidade específica de monitorar os níveis de patógenos. Esta nova abordagem pode fornecer informações valiosas quanto a sensibilidade e especificidade da técnica na detecção de *L. Infantum*.

Uma análise comparativa entre diferentes técnicas não apenas traça as diferenças nos resultados entre elas, mas também sinaliza a influência nas taxas de detecção. Essa compreensão é fundamental para aplicação em pesquisas futuras. Gao *et al.* (2015) utilizaram em sua pesquisa amostras não invasivas de swab do tecido conjuntivo, soro e medula óssea de Cães, e todos os tecidos foram eficazes na detecção da Leishmaniose Visceral Canina, entretanto, dentre as amostras utilizadas a amostra de swab do conjuntivo foi a que apresentou a maior sensibilidade devido ao tropismo que a *L. infantum* possui por este tipo de tecido.

Esses resultados ressaltam a importância de considerar o número amostral utilizado em uma pesquisa e as características específicas de cada tipo de tecido ao

interpretar os resultados dos testes diagnósticos. A variabilidade no DNA total extraído na etapa da extração de DNA também pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles outros parasitas coexistentes ou com sintomas similares (tais como as hemoparasitoses) e com respostas imunes específicas dos hospedeiros (ESTEVAM *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos por meio da curva ROC para as amostras de sangue (53 amostras) com AUC de 1,0 e IC 95% sensibilidade e especificidade de 100%, demonstra a capacidade do teste em distinguir com precisão casos positivos dos casos negativos. A significância estatística, com um valor de 0,001 ( $p < 0,001$ ) e indicou a obtenção de uma AUC precisa (VIEIRA, 2018).

Estes resultados estão em concordância com resultados de Dixit e colaboradores (2018) e Xavier, Edineide Maria (2014) e indicam uma alta precisão na discriminação entre os dois testes diagnósticos (LAMP e qPCR). O intervalo de confiança (IC) para a área sob a curva (AUC), com limites inferiores e superiores denota uma estimativa precisa da verdadeira AUC da população, destacando a estabilidade da medida (VIEIRA, 2018).

Além do que já foi exposto, a detecção da Leishmaniose Visceral Canina apresenta uma série de desafios moleculares. Um dos principais desafios é a variação genética das diferentes cepas de *Leishmania*, que pode influenciar diretamente na sensibilidade e especificidade do diagnóstico (SAMPAIO, 2016). Além disso, a expressão gênica diferencial durante os estágios do ciclo de vida do parasita e a baixa carga parasitária, frequentemente observada em animais infectados, pode impactar diretamente no sucesso da detecção molecular (CAVALCANTI *et al.*, 2014). Outro ponto é a presença de DNA de outros organismos nas amostras clínicas utilizadas no ensaio. Esse material genético pode interferir nos resultados do diagnóstico, tornando essencial o desenvolvimento de estratégias de purificação ou redução desses interferentes (COVA *et al.*, 2015).

A exploração de avanços biotecnológicos na detecção de leishmaniose visceral canina a partir da técnica LAMP oferece perspectivas promissoras para aprimorar a eficiência dos diagnósticos. Uma abordagem que vem sendo bastante utilizada são as vesículas extracelulares, que podem fornecer informações adicionais e até mesmo novos alvos para utilizar no diagnóstico (MENEZES, 2023). Outra ferramenta que vem sendo utilizada para o diagnóstico são os biossensores, eles oferecem a oportunidade de desenvolver métodos rápidos e precisos para a detecção da Leishmaniose Visceral Canina. O uso de técnica LAMP multiplex também é inovadora e permite a identificação simultânea de múltiplos alvos, aumentando a eficiência do diagnóstico (SAMSAMI *et al.*, 2023). Isso é especialmente relevante no contexto da diversidade genética do parasita,

pois pode-se direcionar diferentes regiões do genoma para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste.

Existe ainda a possibilidade de integração de técnicas, como a CRISPR-Cas9 com LAMP, que pode direcionar sequências específicas do genoma do parasita e reduzir a probabilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos (BAO *et al.*, 2020). Todas essas abordagens podem contribuir significativamente para uma detecção mais precisa da leishmaniose visceral canina em pesquisas futuras.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Reação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) foi utilizada neste estudo como ferramenta diagnóstica da Leishmaniose Visceral Canina. A sensibilidade e especificidade do método para detecção do parasita *L. infantum* em amostras de sangue apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% (IC 95%). Foi traçada uma curva ROC para avaliar a acurácia diagnóstica do ensaio para amostras de sangue, esta que obteve uma AUC de 1,00, evidenciando que o ensaio LAMP foi capaz de discriminar entre animais doentes e controles saudáveis. O teste de especificidade dos primers destinados ao gene K- 26 da *L. infantum* demonstrou ser seletivo para a espécie alvo e não revelou reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*). A exploração de avanços biotecnológicos e o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, como a utilização de novos alvos genéticos, biossensores e técnicas multiplex e ainda ensaios envolvendo a integração de LAMP com CRISPR-Cas9, representam uma oportunidade para aprimorar a detecção da leishmaniose visceral canina. Em síntese, o método LAMP permitiu a detecção molecular de *L. infantum* com alta acurácia, dispensou a necessidade de equipamentos complexos e onerosos. Este progresso representa não apenas uma contribuição técnica valiosa, mas também uma promissora ferramenta para a abordagem de desafios em saúde pública, especialmente em regiões endêmicas e com recursos limitados.

## 7 REFERÊNCIAS

ABBASI, Ibrahim *et al.*. *Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of Leishmania DNA in human blood samples*. **Acta Tropica**, v. 162, p. 20-26, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.009>>.

ADAMS, Emily Rebecca *et al.*. *Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 07, p. e00386-18, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jcm.00386-18>>.

AKHOUNDI, Mohammad *et al.*. *A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 03, p. e0004349, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>>.

ALVES, Elinston Ambos. **Acompanhamento de projetos de pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Orientadores: DELATORRE, Carla Andréa (orientador); SOBRENOME, Nome (coorientador). 42 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - CG-AGRONOMIA (Bacharelado em Agronomia), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2021. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/252882>>.

AVELAR, Daniel Moreira de; CARVALHO, Débora Moreira; RABELLO, Ana. *Development and clinical evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Brazil*. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 8240784 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/8240784>>.

AZAMI-CONESA, Iris *et al.*. *Invasive species as hosts of zoonotic infections: the case of american mink (neovison vison) and leishmania infantum*. **Microorganisms**, v. 09, n. 07, p. 1531, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071531>>.

BARBOSA JÚNIOR, Walter Lins *et al.*. **Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de Leishmania infantum em amostras clínicas positivas para**



**leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.** Orientadores: MEDEIROS, Zulma Maria de (orientador); MELO, Fábio Lopes de (coorientador). 62 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BBS (Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Recife, 2016. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/14323>>.

BI, Kaiming *et al.*. *Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study.* **BioMed Research International**, v. 2018, p. 9872095, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/9872095>>.

BAO, Yijuan *et al.*. *CUT-LAMP: contamination-free loop-mediated isothermal amplification based on the CRISPR/Cas9 cleavage.* **ACS Sensors**, v. 05, n. 04, p. 1082-1091, 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.0c00034>>.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. *Leishmaniasis—authors' reply.* **The Lancet**, v. 393, n. 10174, p. 872-873, 2019. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)33057-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)33057-5)>.

CAVALCANTI, Amanda dos Santos. **Leishmaniose visceral canina correlação da resposta imunológica com a carga parasitária e a variabilidade genética do parasita.** Orientadores: PORROZZI, Renato (orientador); MORAES, Milton Ozório (coorientador). 136 f.. Tese (Doutorado) - PPG-BCM (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13516>>.

CELESTE, Jordanna Luiza de Lima *et al.*. *Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Leishmania amazonensis in skin samples.* **Experimental Parasitology**, v. 203, p. 23-29, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.006>>.

CLOS, Joachim; GRÜNEBAST, Janne; HOLM, Myrine. *Promastigote-to-amastigote conversion in leishmania spp.: molecular view.* **Pathogens**, v. 11, n. 09, p. 1052, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens11091052>>.

COHEN, Jérémie F. *et al.*. *STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration*. **BMJ Open**, v. 06, n. 11, p. e012799, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012799>>.

COVA, Bruno *et al.*. Padronização das condições para a extração automatizada do DNA de flebotomíneos no Laboratório Central de Saúde Pública da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 39, p. 125-125, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.22278/2318-2660.2015.v39.n0.a2236>>.

DIAS, Renata Cristina Ferreira *et al.*. *Autochthonous canine visceral leishmaniasis cases occur in Paraná state since 2012: isolation and identification of Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 01, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612019083>>.

DIXIT, Keerti Kaumudee *et al.*. *Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL)*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006922, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006922>>.

ESTEVAM, Letícia Gracielle Tôrres de Miranda. **Leishmaniose visceral canina: aspectos epidemiológicos em ambientes com elevado número de animais e o estudo de Ctenocephalides felis felis no ciclo de Leishmania infantum**. Orientadores: ANDRADE FILHO, José Dilermando (orientador); PAZ, Gustavo Fontes (coorientador). 114 f.. Tese (Doutorado) - PPG-CS (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Belo Horizonte, 2023. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/59888>>.

FREIRE, Mariana Lourenço. **Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana**. Orientadores: RABELLO, Ana Lúcia Teles (orientador); ASSIS, Tália Santana Machado de (coorientador). 101 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-C (Programa de Pós-Graduação em Ciências), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Belo Horizonte, 2017. Disponível em:

<<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19516>>.

GAO, Chun-hua *et al.*. *Development of a LAMP assay for detection of Leishmania infantum infection in dogs using conjunctival swab samples*. **Parasites & Vectors**, v. 08, n. 370, p. 01-08, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0991-2>>.

GHASEMIAN, Mehrdad *et al.*. *Development and assessment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Iran*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 09, n. 01, p. 50-59, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25642260/>>.

GIRARDON, Luis Felipe *et al.*. A importância do desenho de *primers*. In: **ENPOS (Encontro de Pós-Graduação)**, XI, Pelotas. Anais. Anais do [...]. Pelotas: UFPel, p. 01-04, 2016. Disponível em: <[https://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA\\_01908.pdf](https://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01908.pdf)>.

GONÇALVES, Daniela da Silva. **Deteção da bactéria Wolbachia em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop)**. Orientadores: MOREIRA, Luciano Andrade (orientador). 78 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-CS (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10028>>.

GUIMARÃES, M.. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 02, p. 117-120, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86821985000200009>>.

HUANG, H.-S. *et al.*. *Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 10, p. 1055-1063, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>>.

KANOMATA, Patricia Yukari. **Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral canina após o desafio experimental com Leishmania infantum**. Orientadores: SOARES, Rodrigo Dian de

Oliveira Aguiar (orientador); REIS, Alexandre Barbosa (coorientador). 55 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - CG-FARMÁCIA (Bacharelado em Farmácia), UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, 2022. Disponível em: <<https://www.monografias.ufop.br/handle/35400000/3760>>.

KHAN, Md Anik Ashfaq *et al.*. *Development of quantitative rapid isothermal amplification assay for Leishmania donovani*. **Diagnosics**, v. 11, n. 11, p. 1963, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/diagnostics11111963>>.

JAIN, Keerti; JAIN, N. K.. *Vaccines for visceral leishmaniasis: a review*. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 01-12, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>>.

LACERDA, Sarah de Souza *et al.*. **Desenvolvimento de sistemas baseados em amplificação isotérmica em alça (LAMP) para o diagnóstico da doença de Chagas**. Orientadores: MELO, Fábio Lopes de Melo (orientador); CARVALHO, Bruno de Melo (coorientador). 84 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BBS (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Recife, 2021. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/55119>>.

LI, Hao *et al.*. *Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of porcine pegivirus*. **Journal of Virological Methods**, v. 270, p. 59-65, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.019>>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA/MAPA nº. 04, de 19 de fevereiro de 2008**. Aprova as normas técnicas para a fiscalização da produção, controle, comercialização, modo de utilização de produtos de uso veterinário destinados a diagnosticar doenças dos animais. DOU (Diário Oficial da União), seção 1, Brasília/DF, 20 de fev. de 2008. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-no-4-19-02-2008.pdf/view>>.

MASOUDZADEH, Nasrin; MIZBANI, Amir; RAFATI, Sima. *Transcriptomic profiling in cutaneous Leishmaniasis patients*. **Expert Review of Proteomics**, v. 17, n. 07-08, p. 533-541, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1812390>>.

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. 08, p. 1924-1933, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c7an01897e>>.

MELLO, Danyele Costa de *et al.*. **Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar**. Orientadores: SCHINDLER, Haiana Charifker (orientador); MONTENEGRO, Rosana de Albuquerque (coorientador). 75 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BBS (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Recife, 2022. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/58498>>.

MENEZES, Saulo Almeida de. **Vesículas extracelulares em doenças parasitárias: da patogênese à futuras ferramentas diagnósticas**. Orientadores: TASCA, Tiana (orientador). 78 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Especialização em Microbiologia Clínica, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2023. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/271476>>.

MOEHLING, Taylor J. *et al.*. *LAMP diagnostics at the point-of-care: emerging trends and perspectives for the developer community*. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 01, p. 43-61, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1873769>>.

MUKHTAR, Maowia *et al.*. *Sensitive and less invasive confirmatory diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 02, p. e0006264, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006264>>.

NOTOMI, Tsugunori *et al.*. *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. **Nucleic Acids**

*Research*, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>>.

NZELU, Chukwunonso O.; KATO, Hiroto; PETERS, Nathan C.. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>>.

OLIVEIRA, Dara Karen Freire de *et al.*. Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 02, p. 01-14, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.46551/ruc.v23n2a03>>.

REIS, Levi Eduardo Soares. **Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (seminested PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele e de baço de cães com leishmaniose visceral**. Orientadores: REIS, Alexandre Barbosa (orientador); VITAL, Wendel Coura (coorientador). 82 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-CF (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, 2013. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/3364>>.

RIBEIRO, Sarah Amado; CRUZ, Alex Silva da; CRUZ, Aparecido Divino da. *Loop mediated isothermal amplification assay (LAMP): uma revisão detalhada sobre a técnica*. **Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 48, n. 01, p. 8809-8809, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.18224/evs.v48i1.8809>>.

RUITER, C. M. de *et al.*. *Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 09, p. 3147-3155, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.00372-14>>.

SAHOO, P. R.; SETHY, K.; MOHAPATRA, S.; PANDA, D.. *Loop mediated isothermal amplification: an innovative gene amplification technique for animal diseases*. **Veterinary World**, v. 09, n. 05, p. 465-469, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>>.

SALARI, Samira *et al.*. A novel rapid LAMP test for identification of cutaneous leishmaniasis: an evaluation and comparative analysis of three molecular methods. *Microbial Pathogenesis*, v. 169, p. 105612, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105612>>.

SAMPAIO, Bruna Matarucco. **Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum* chagasi baseado em genes nucleares e mitocondriais**. Orientadores: MARCILI, Arlei (orientador). 56 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-EEAZ (Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), USP (Universidade de São Paulo), São Paulo, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.10.2016.tde-26092016-123454>>.

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, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2023/9326183>>.

SÁNCHEZ, Edwin *et al.*. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista Con-ciencia*, v. 02, n. 01, p. 127-140, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652014000100014](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100014)>.

SHARMA, Sanjay *et al.*. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Ureaplasma diversum* from cervico-vaginal swab of buffaloes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 190, n. 04, p. 1201-1211, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-019-03155-2>>.

SILVA, Alessandra Ferreira da. **Vigilância da leishmaniose visceral americana no município de São Paulo**. Orientadores: GALATI, Eunice Aparecida Bianchi (orientador). 127 f.. Tese (Doutorado) - PPG-SP (Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública), USP (Universidade de São Paulo), São Paulo, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/T.6.2015.tde-21082015-130205>>.

SILVA, Raizza *et al.*. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 07, p. 625-629, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700011>>.

SUKPHATTANAUDOMCHOKE, Charanyarut *et al.*. *Simplified closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for visual diagnosis of Leishmania infection*. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105651, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105651>>.

TAKAHASHI, R. *et al.*. *Development and application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for rapid detection of Pythium helicoides*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 355, n. 01, p. 28-35, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12453>>.

TELES, Pedro Paulo de Abreu *et al.*. **Distúrbios mieloproliferativos associados ao estadiamento clínico da Leishmaniose Canina (LCan)**. Orientadores: TAFURI, Wagner Luiz (orientador); LEME, Fabíola de Oliveira Paes (coorientador). 60 f.. Tese (Doutorado) - PPG-P (Programa de Pós-Graduação em Patologia), UFMG ( Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 2023. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/55538>>.

THAKUR, Shivani; JOSHI, Jyoti; KAUR, Sukhbir. *Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 02, p. 253-272, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>>.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. *Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens*. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 01, p. 79-99, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>>.

VERMA, Sandeep *et al.*. *Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 04, p. 390-395, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011>>.



VIANA, Agostinho Gonçalves *et al.*. *Leishmania infantum* induces expression of the negative regulatory checkpoint, CTLA-4, by human naïve CD8+ T cells. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 09, p. e12659, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/pim.12659>>.

VIANA, K. F.. **Metodologia para ensaios de candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina pelo co-cultivo de linfócitos e macrófagos infectados com *Leishmania chagasi***. Orientadores: GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro (orientador); REIS, Alexandre Barbosa (coorientador). 73 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BIOTEC (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto, 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/3457>>.

YAN, Lei *et al.*. *Isothermal amplified detection of DNA and RNA*. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 05, p. 970-1003, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C3MB70304E>>.

VIEIRA, Sonia. **Bioestatística: tópicos avançados-testes não paramétricos, testes diagnósticos, medidas de associação e concordância**. Rio de Janeiro: *Elsevier Brasil*, 2018. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/pt-br>>.

XAVIER, Edeneide Maria. **Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a Leishmaniose visceral**. Orientadores: BALBINO, Valdir de Queiroz (orientador); BRANDÃO FILHO, Sinval Pinto (coorientador); CAVALCANTI, Milena de Paiva (coorientador). 82 f.. Tese (Doutorado) - PPG-G (Programa de Pós-Graduação em Genética), UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), Recife, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/14090>>.

ZEN, Lee Phone Youth *et al.*. *End-point detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) on malaria by direct observation with colorimetric dyes*. **Experimental Parasitology**, v. 239, p. 108310, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108310>>.

## ANEXOS

### Anexo A – Amostras utilizadas no presente estudo

Quadro 1. Amostras utilizadas no presente estudo

Tipo de amostra	Data da extração	Resultado	kit de extração	Número interno
Sangue	07/07/2023	<b>Positivo</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	1
Sangue	12/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	2
Sangue	12/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	3
Sangue	12/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	4
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	5
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	6
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	7
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	8
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	9
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	10
Sangue	25/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	11
Sangue	31/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	12
Sangue	31/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	13
Sangue	31/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	14
Sangue	31/07/2023	<b>Positivo</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	15
Sangue	31/07/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	16
Sangue	02/08/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	17
Sangue	02/08/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	18
Sangue	02/08/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	19
Sangue	02/08/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	20
Sangue	03/08/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	21
Sangue	07/08/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	22
Sangue	07/08/2023	Negativa	Miniprep Plus Quick-DNA	23
Sangue	07/08/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	24
Sangue	07/08/2023	<b>Positivo</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	25
Sangue	07/08/2023	Negativa	Biogene	26
Sangue	07/08/2023	Negativa	Miniprep Plus Quick-DNA	27
Sangue	24/08/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	28
Sangue	24/08/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	29
Sangue	03/09/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	30
Sangue	14/09/2023	Negativa	Miniprep Plus Quick-DNA	31
Sangue	18/09/2023	Negativa	Miniprep Plus Quick-DNA	32
Sangue	18/09/2023	Negativa	Miniprep Plus Quick-DNA	33
Sangue	22/09/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	34
Sangue	22/09/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	35

Sangue	22/09/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	36
Sangue	22/09/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	37
Sangue	25/09/2023	Negativo	Miniprep Plus Quick-DNA	38
Sangue	27/09/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	39
Sangue	28/09/2023	<b>Positiva</b>	Miniprep Plus Quick-DNA	40
Sangue	04/10/2023	<b>Positiva</b>	BioGene	41
Sangue	04/10/2023	Negativo	BioGene	42
Sangue	20/09/2023	Negativo	BioGene	43
Sangue	20/09/2023	Negativo	BioGene	44
Sangue	20/09/2023	Negativo	BioGene	45
Sangue	20/09/2023	<b>Positiva</b>	BioGene	46
Sangue	09/10/2023	<b>Positiva</b>	BioGene	47
Sangue	09/10/2023	<b>Positiva</b>	BioGene	48
Sangue	09/10/2023	Negativo	BioGene	49
Sangue	09/10/2023	Negativo	BioGene	50
Sangue	09/10/2023	Negativo	BioGene	51
Sangue	16/10/2023	Negativo	BioGene	52
Sangue	23/11/2023	Negativo	BioGene	53

Fonte: da autora, 2024.

**Anexo B – Equipamentos e reagentes da PCR convencional****Quadro 2.** Equipamentos e reagentes da PCR convencional

<b>Material</b>	<b>Volume do reagente em 1 reação</b>
Kit Taq Polimerase, 250 unid. com tampão, MgSO <sub>4</sub> e dNTP, da empresa Biolabs	40µL
Água para biologia molecular, 1 Litro, da empresa Sigma	40µL
Oligo <i>Forward</i> (2µM) e <i>Reverse</i> (2 µM), da empresa <i>Extend</i>	1µL
Agarose, 25g, da empresa Sigma	-
Gel <i>red</i> , da empresa <i>Uniscience</i>	2µL
Padrão de peso Molecular, 01 Kpb, da empresa Biolabs	2µL

**Fonte:** da autora, 2024.

**Anexo C – Equipamentos e reagentes da LAMP****Quadro 3.** Equipamentos e reagentes da LAMP

<b>Material</b>	<b>Volume do reagente em 1 reação</b>
Bst DNA polimerase 2.0 Cellco 10.000X (POL-133L)	1 $\mu$ L
F3 e B3 (purificados por dessalinização)	1 $\mu$ L
FLP e BLP (purificados por dessalinização)	1 $\mu$ L
FIP e BIP (purificados por HPLC)	1 $\mu$ L
Água para biologia molecular Sigma, 1 Litro	40 $\mu$ L
Betaína (Sigma)	15 $\mu$ L
SYBR Green <sup>TM</sup> (marca)	3 $\mu$ L
dNTP 10 mM (Cellco)	15 $\mu$ L

**Fonte:** da autora, 2024.