



VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO DE qPCR COM OS MARCADORES *ITS1* E *HSP70* PARA O DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS, AMAZONAS, BRASIL

DIOGO MATOS DOS SANTOS

**MANAUS
2026**

DIOGO MATOS DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO DE qPCR COM OS MARCADORES *ITS1* E *HSP70*
PARA O DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS, AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicada a Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador Prof. Dr: André Luiz Leturiondo
Coorientador: Prof.Dr: Felipe Jules de Araujo Santos

MANAUS
2026

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

D722v	<p>DOS SANTOS, Diogo Matos</p> <p>Validação de um ensaio de qPCR com os marcadores ITS1 e HSP70 para o diagnóstico e identificação de espécies da leishmaniose tegumentar americana em amostras clínicas, Amazonas, Brasil / Diogo Matos DOS SANTOS. Manaus : [s.n.], 2026.</p> <p>117 f.: color.; 21.0 cm.</p> <p>Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia-PPGDE- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2026.</p> <p>Inclui Bibliografia.</p> <p>Inclui Apêndice.</p> <p>Inclui Anexo.</p> <p>Orientador: ANDRE LUIZ LETURIONDO.</p> <p>Coorientador: FELIPE JULES DE ARAUJO SANTOS.</p> <p>1. Leishmaniose. 2. Diagnóstico Molecular. 3. qPCR. 4. ITS1. 5. HSP70. I. ANDRE LUIZ LETURIONDO (Orient.) II . FELIPE JULES DE ARAUJO SANTOS (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título</p> <p>CDU(1997)616.5(043.3)</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO**VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO DE qPCR COM OS MARCADORES *ITS1* E *HSP70* PARA O DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS, AMAZONAS, BRASIL****Diogo Matos dos Santos**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências aplicadas a Dermatologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Alfredo da Matta.

Aprovada em: 29/ 04 / 2026

BANCA JULGADORA:

Dr. André Luiz Leturiondo
Presidente

Dr. José do Espírito Santo Júnior
Membro

Dra. Carolina Chrusciak Talhari Cortez
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, fonte de toda sabedoria, por ter me ajudado e guiado meus passos até aqui, mesmo nos momentos em que pensei em desistir.

Aos amores da minha vida, minhas filhas Isabelle dos Santos Pantoja e Tânia Sophia Gonçalves dos Santos.

À minha família, na pessoa da minha mãe, do meu pai, da minha esposa, do meu irmão e do meu sobrinho; sem o apoio de vocês, eu não teria conseguido.

E aos pacientes acometidos pela leishmaniose, que enfrentam tantos desafios com dignidade e esperança. Que este estudo seja um instrumento capaz de levar conforto e dignidade a quem precisar

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Jesus Cristo, conselheiro, Deus forte e Rei do universo, por permitir que eu passasse por tudo e chegasse até aqui, dando-me forças para não desistir e chegar ao final.

À Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, pela imensa oportunidade de realizar este mestrado, que foi um marco transformador em minha jornada acadêmica e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Leturiondo, e, especialmente, ao meu coorientador, Prof. Dr. Felipe Jules de Araújo Santos, pelas orientações no mestrado, com grandes ensinamentos científicos, técnicos e morais.

Aos amores da minha vida, minhas filhas Isabelle Pantoja dos Santos e Tânia Sophia Gonçalves dos Santos; é por vocês que eu luto todos os dias para ser alguém melhor.

À minha família, meu pilar em um mundo de incertezas, onde cada um — Antônia, Damião, Romonica, Daniel, Railene, Isaac, Felipe e Lucas — representa uma parte de mim, presente em cada passo que dou e em cada palavra que escrevo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta — Guilherme, Izabele, Anna, Jackeline, Nathalia, Cynthia e Camila —, por todo o apoio e auxílio no momento em que mais precisei.

Ao gestor da Escola Estadual Frei Mário Monacelli, Cleucimar Roberto de Castro, e ao seu fiel escudeiro, Leandro da Silva Albuquerque, pelo apoio e colaboração sempre que solicitados.

Aos funcionários da escola e meus amigos Andréa, Agnaldo e Carlen Maressa, pelos conselhos, conversas e todo o incentivo que me deram.

Minha eterna gratidão a todos os professores que ministraram as disciplinas, em especial à Dra. Carolina Talhari, e aos colegas de turma, que contribuíram para a construção do conhecimento acadêmico necessário para este estudo.

Minha gratidão à Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pelo apoio essencial na estrutura e organização do curso, bem como pela disponibilização de laboratórios e equipamentos indispensáveis para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo recurso financeiro destinado a este estudo.

EPÍGRAFE

"A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderíamos encontrar em outro lugar o que ela não pode nos dar." – Sigmund Freud.

RESUMO

Introdução: As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que incluem os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, ambos de relevância médica. A manifestação clínica da doença é variável; entretanto, o diagnóstico ainda representa um desafio, pois os métodos tradicionais, como a microscopia, apresentam baixa sensibilidade e não permitem a identificação das espécies. Essa identificação é fundamental para o tratamento e o controle da doença, uma vez que a conduta terapêutica varia de acordo com a espécie. O antimonial de meglumina ou a anfotericina B são recomendados para *L. (V.) braziliensis*, enquanto a pentamidina ou a anfotericina B são indicadas para *L. (V.) guyanensis*. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um painel de qPCR para o diagnóstico molecular e a identificação de espécies de leishmaniose, comparando sua eficácia em amostras de biópsia e de papel de filtro. **Metodologia:** Foi realizado um estudo prospectivo com 442 pacientes com suspeita clínica de leishmaniose. Ensaios de qPCR com sondas TaqMan™ foram desenvolvidos, utilizando os genes *ITS1* e *HSP70* para a detecção dos subgêneros e das espécies. A microscopia foi utilizada como padrão ouro. A acurácia diagnóstica, a concordância entre os testes e a correlação entre a carga parasitária e as características clínicas foram avaliadas por meio de análises estatísticas, como sensibilidade, especificidade, índice Kappa e método de Bland-Altman. **Resultados:** Os ensaios de qPCR demonstraram sensibilidade de 99,7% e especificidade de 94–95% em comparação com a microscopia. A concordância entre os ensaios moleculares e o padrão ouro foi quase perfeita (Kappa de 0,95–0,96). *L. (V.) guyanensis* (83%) e *L. (V.) braziliensis* (12%) foram identificadas como as espécies predominantes. Os ensaios validaram o uso de amostras de papel de filtro, que apresentaram desempenho comparável ao das biópsias. **Conclusão:** O painel de qPCR desenvolvido constitui uma ferramenta robusta e prática para o diagnóstico da leishmaniose, oferecendo vantagens significativas em relação à microscopia, incluindo a identificação de espécies e a validação do uso de amostras em papel de filtro.

Palavras-chave: Leishmaniose; Diagnóstico Molecular; qPCR; *ITS1* e *HSP70*.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniases are infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which include the subgenera *Leishmania* and *Viannia*, both of medical relevance. The clinical manifestation of the disease is variable; however, diagnosis still represents a challenge, as traditional methods such as microscopy have low sensitivity and do not allow species identification. This identification is essential for disease treatment and control, since therapeutic management varies according to the species. Meglumine antimoniate or amphotericin B are recommended for *L. (V.) braziliensis*, while pentamidine or amphotericin B are indicated for *L. (V.) guyanensis*. **Objectives:** This study aimed to develop and validate a qPCR panel for molecular diagnosis and species identification of leishmaniasis, comparing its effectiveness in biopsy and filter paper samples. **Methodology:** A prospective study was conducted with 442 patients with clinical suspicion of leishmaniasis. qPCR assays using TaqMan™ probes were developed, targeting the *ITS1* and *HSP70* genes for detection of subgenera and species. Microscopy was used as the gold standard. Diagnostic accuracy, agreement between tests, and the correlation between parasite load and clinical characteristics were evaluated using statistical analyses such as sensitivity, specificity, Kappa index, and Bland–Altman method. **Results:** The qPCR assays showed a sensitivity of 99.7% and specificity of 94–95% compared to microscopy. Agreement between molecular assays and the gold standard was almost perfect (Kappa = 0.95–0.96). *L. (V.) guyanensis* (83%) and *L. (V.) braziliensis* (12%) were identified as the predominant species. The assays validated the use of filter paper samples, which showed performance comparable to biopsy samples. **Conclusion:** The developed qPCR panel is a robust and practical tool for the diagnosis of leishmaniasis, offering significant advantages over microscopy, including species identification and validation of filter paper samples.

Keywords: Leishmaniasis; Molecular Diagnosis; qPCR; *ITS1* and *HSP70*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variações clínicas da leishmaniose tegumentar americana.

Figura 2: Mapa da incidência da leishmaniose tegumentar americana forma cutânea no mundo.

Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania*.

Figura 4: leishmaniose tegumentar americana – forma cutânea.

Figura 5: Curvas padrão para os sistemas de qPCR.

Figura 6: Curvas ROC com os respectivas AUC.

Figura 7: Gráfico de Bland-Altman.

Figura 8: Regressão linear entre os valores de C_t e o tempo de evolução das lesões em amostras extraídas de biópsias e papel de filtro.

Figura 9: Regressão linear entre os valores de C_t e o tempo de evolução das lesões em amostras extraídas de biópsias.

Figura Suplementar 1. Fluxograma diagnóstico para qPCR e sequenciamento de DNA para detecção molecular de subgênero e espécie.

Figura Suplementar 2. Curvas ROC e respectivas AUC estratificado por amostras.

Figura Suplementar 3. Representação em Boxplot dos valores de C_t com uma abordagem comparativa entre os métodos de amostragem.

Figura Suplementar 4. Representação em Boxplot dos valores de C_t para VSS com uma abordagem comparativa entre as espécies de *Leishmania*.

Figura Suplementar 5. Representação em Boxplot dos valores de C_t para marcadores moleculares em comparação com a localização da lesão em amostras de biópsia e Papel de filtro.

Figura Suplementar 6. Representação em Boxplot dos valores de C_t para marcadores moleculares em comparação com a localização da lesão em amostras de biópsia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies utilizadas como cepas de referências no estudo.

Tabela 2: Sequências dos primers e da sonda, alvo e parâmetros da curva padrão.

Tabela 3: Sensibilidade e especificidade da detecção de *Leishmania* por qPCR em comparação com a microscopia.

Tabela 4: Valores do Índice Kappa em métodos moleculares aplicados a amostras clínicas.

Tabela suplementar 1: Cepas, espécies, origem e números de acesso no GenBank (*HSP70*) de isolados de *Leishmania spp.* utilizados para o desenho de primers e sondas.

Tabela suplementar 2: Cepas, espécies, origem e números de acesso no GenBank (*ITS1*) de isolados de *Leishmania spp.* utilizados para o desenho de primers e sondas.

Tabela suplementar 3: Otimização das concentrações de primers e sondas para ensaios de qPCR para *Leishmania*.

Tabela suplementar 4: Cálculos da massa de DNA equivalente a um parasita.

Tabela suplementar 5: Resultados dos ensaios de inclusividade e exclusividade para *Leishmania* e outras espécies de microrganismos.

Tabela suplementar 6: Características demográficas e clínicas basais dos participantes do estudo (N=442).

Tabela suplementar 7: Patologias detectadas em amostras negativas para leishmaniose por qPCR e microscopia.

Tabela suplementar 8: Sensibilidade e especificidade dos sistemas moleculares estratificados em biópsias e papel de filtro em comparação com a microscopia.

Tabela suplementar 9: Modelo de regressão linear múltipla entre os valores de C_t e as variáveis independentes, incluindo tempo e número de lesões.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndromes* - Síndrome da imunodeficiência adquirida;

AUC - do inglês *Area Under the Curve* - Área sob a Curva;

Pb - Pares de Bases;

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa;

C1 - Concentração inicial;

C2 - Concentração final;

CG - Citosina e Guanina;

IC - Intervalo de confiança;

C_t - Do inglês *Cycle threshold* - Limiar do ciclo;

ADN - Ácido Desoxirribonucleico;

DP - Desvio padrão;

fg - Fentograma;

g - Grama;

g/μL - Grama por microlitro;

HSP70 - Do inglês *Heat Shock Protein 70* - Proteína de choque térmico 70;

ITS1 - Do inglês *Internal Transcribed Spacer 1* - Espaçador Interno Transcrito 1;

LC - Leishmaniose Cutânea;

LM - Leishmaniose Mucocutânea;

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana;

LV - Leishmaniose Visceral;

M – Massa;

ml - Mililitro;

MLEE - Do inglês *multi-site enzyme electrophoresis* - Sistema de múltiplas enzimas da eletroforese;

mg - Miligrama;

mg/g - Miligrama por grama;

ng - Nanograma;

nM – Nanomolar;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

PCR - Do inglês *polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase;

qPCR - Do inglês *Quantitative polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase quantitativa;

RFLP - Do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição;

ARN - Ácido ribonucleico;

ROC - Do inglês - *Receiver Operating Characteristic* - Característica de operação do receptor;

LSS - Do inglês *Leishmania Subgenus System* -

VSS - Do inglês *Viannia Subgenus System* -

SSG - Do inglês *Species Systems for L. (V.) guyanensis* - Sistemas de espécies para *L. (V.) guyanensis*;

SSB - Do inglês *Species Systems for L. (V.) braziliensis* - Sistemas de espécies para *L. (V.) guyanensis*;

STARD - Do inglês *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies- Padrões para Relato de Estudos de Acurácia Diagnóstica*

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido;

V1 - Volume inicial;

V2 - Volume final;

VPN - Valor preditivo negativo;

VPP - Valor preditivo positivo;

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos históricos, gerais e epidemiológicos.....	1
1.2 Agente etiológico e ciclo biológico	5
1.3 Formas clínicas	8
1.4 Diagnóstico	10
1.5 Gene ITS1.....	13
1.6 Gene HSP70	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Declaração de ética.....	20
4.2 Cepas de Referências	20
4.3 Amostras clínicas	21
4.4 Extração de DNA	22
4.5 Seleção dos alvos moleculares	22
4.6 Desenho de Primers e sondas	22
4.7 Análise in sílico dos alvos moleculares selecionados.....	23
4.8 Otimização da qPCR	23
4.9 Curva padrão	24
4.10 Ensaio de Inclusividade e Exclusividade	24
4.11 Sequenciamento de DNA para o alvo HSP70.....	25
4.12 Análise estatística	25
5. RESULTADOS	28
5.1 Desenvolvimento dos sistemas de qPCR para detecção de Leishmania.....	28
5.2 Estabilização e eficiência da qPCR.....	30
5.3 Inclusividade e Exclusividade	31
5.4 Algoritmo de detecção diferencial: identificação molecular de subgêneros e espécies de Leishmania	32
5.5 Avaliação da Confiabilidade Diagnóstica: Métricas de Validação e Curva ROC	33
5.6 Variação dos valores de dos sistemas moleculares em função do tipo de amostragem, das espécies e localização das lesões.....	37
5.7 Análise comparativa dos marcadores moleculares: Correlação entre valores de com a progressão temporal e o número de lesões.	38

6. PRODUTO	41
7. DISCUSSÃO	42
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	47
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	48
10. CONCLUSÃO.....	49
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
12. APÊNDICE A - ORÇAMENTO.....	65
13. APÊNDICE B - EQUIPE DO PROJETO	66
14. APÊNDICE C - CRONOGRAMA.....	67
15. APÊNDICE D - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO CEP FUHAM.....	68
16. APÊNDICE E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE (CONTINUA)	69
17. APÊNDICE F - TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS – TCUD (CONTINUA).....	73
18. APÊNDICE G - APROVAÇÃO DO RECURSO FINANCEIRO PELA FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO AMAZONAS. (FAPEAM)	74
19. APÊNDICE H - TABELAS SUPLEMENTARES	75
Tabela suplementar 1	75
Tabela suplementar 2	78
Tabela suplementar 3	81
Tabela suplementar 4.....	82
Tabela suplementar 5	83
Tabela Suplementar 6.....	84
Tabela Suplementar 7.....	85
Tabela Suplementar 8.....	86
Tabela Suplementar 9.....	87
20. APÊNDICE I - FIGURAS SUPLEMENTARES	88
Figura Suplementar 1.....	88
Figura Suplementar 2	89
Figura Suplementar 3	90
Figura suplementar 4	91
Figura suplementar 5.....	92
Figura Suplementar 6.....	94
21. APÊNDICE J - PROTOCOLO TÉCNICO LABORATORIAL DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA NO ESTADO DO AMAZONAS (CONTINUA).....	96
22. APÊNDICE K – ARTIGO SUBMETIDO	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos, gerais e epidemiológicos

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença que remonta a séculos passados, sendo mencionada em textos desde a Antiguidade (1). Trata-se de uma doença originária de regiões tropicais e subtropicais, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotomíneos, também conhecidos como mosquito-palha (2).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Esse gênero inclui quatro subgêneros (*Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*), dos quais dois apresentam relevância para a medicina humana. No subgênero *Leishmania*, estão incluídas as espécies *L. (Leishmania) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, do Velho Mundo, e as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis*, do Novo Mundo (2). Já no subgênero *Viannia*, as espécies do Novo Mundo incluem *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* (3).

Dependendo da espécie envolvida e das características do hospedeiro, a manifestação clínica pode variar entre a forma assintomática, a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose visceral (LV) (4) (**Figura 1**).

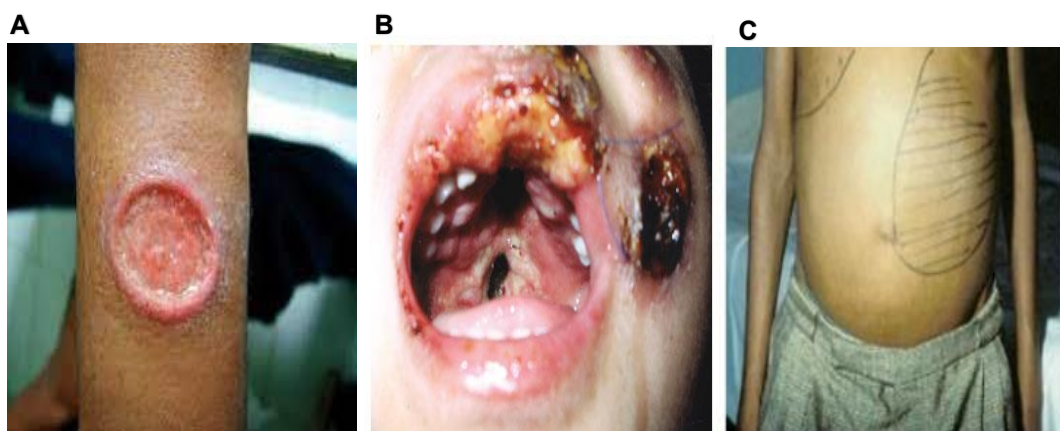


Figura 1. Variações clínicas da leishmaniose tegumentar americana. (A) Leishmaniose cutânea; (B) L. mucosa; (C) L. visceral. Fonte: (5,6,7).

A LTA (leishmaniose tegumentar americana) faz parte de um grupo de doenças denominadas “doenças negligenciadas”, que acometem milhares de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (8). Apesar do impacto devastador na saúde pública, essas doenças são frequentemente deixadas à margem das pesquisas e do desenvolvimento farmacêutico, que tendem a se concentrar em enfermidades que afetam países mais ricos (8).

Essa doença é um exemplo claro dessa marginalização: uma enfermidade grave que, apesar de sua severidade, recebe pouca atenção e investimento em pesquisa e tratamento (8). Apresenta distribuição mundial, com maior prevalência na África, Ásia e Américas. Cerca de 84% dos casos são notificados em dez países, como Brasil, Colômbia e Peru. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um bilhão de indivíduos habitam regiões endêmicas para essa doença, o que reforça seu status crítico como um desafio significativo para a saúde pública (9). (**Figura 2**).

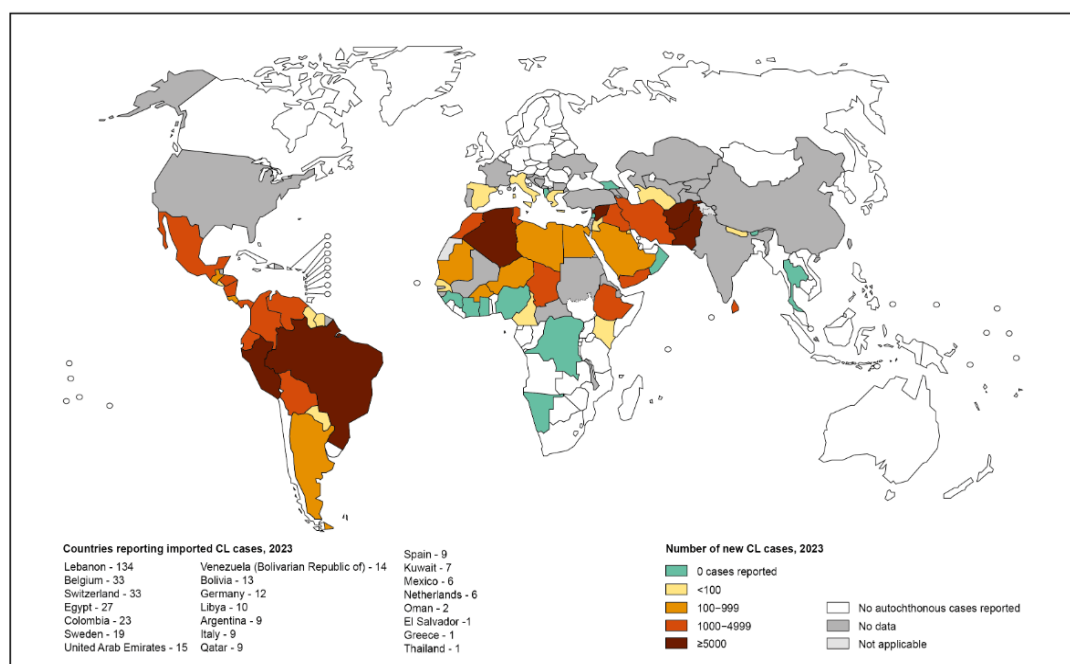


Figura 2: Mapa da incidência da leishmaniose tegumentar americana forma cutânea no mundo. Fonte: WHO, 2024 (9).

Historicamente, a LTA tem sido uma ameaça constante, especialmente em áreas com condições socioeconômicas desfavoráveis, onde o controle dos vetores e o acesso a tratamentos adequados são escassos, perpetuando um ciclo de vulnerabilidade e sofrimento (10). Os insetos flebotomíneos são vetores

essenciais na propagação da doença, que afeta tanto humanos quanto animais, desencadeando diferentes formas clínicas, desde lesões cutâneas simples até formas viscerais graves que podem levar à morte (11).

Epidemiologicamente, a LTA apresenta ampla distribuição geográfica, estando presente em diversos países ao redor do mundo, com maior incidência em áreas onde as condições sanitárias são precárias e o ambiente é propício à proliferação dos vetores (11).

Esse cenário complexo envolve variáveis ambientais, climáticas e sociais que contribuem para a persistência e disseminação da doença, exigindo abordagens integradas de controle e prevenção (11). Ademais, fatores socioeconômicos, como pobreza e desigualdade, agravam os impactos da leishmaniose, criando barreiras adicionais ao acesso ao diagnóstico precoce e ao tratamento adequado (12).

Outro fator que favorece a propagação da doença é a falta de recursos financeiros para campanhas de educação em saúde e para investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, o que limita ainda mais as opções disponíveis para o enfrentamento dessa doença negligenciada globalmente (12).

Assim, é imperativo adotar abordagens multidisciplinares que considerem não apenas os aspectos biológicos da doença, mas também suas interações complexas com fatores ambientais, climáticos e sociais. Diante dessas circunstâncias, os dados epidemiológicos precisam ser considerados de forma integrada (12).

Portanto, sob esses aspectos, a LTA caracteriza-se como uma doença infecciosa e zoonótica, que se manifesta como um espectro de formas clínicas, abrangendo regiões da Ásia, Europa e Américas (13). Globalmente, estima-se a ocorrência de 700.000 a 1 milhão de novos casos por ano (14). Os países mais afetados são aqueles com climas tropicais e subtropicais, como Índia, Sudão, Afeganistão e Brasil (14). A leishmaniose visceral (LV) é mais prevalente na Índia

e no Sudão, enquanto a leishmaniose cutânea predomina em países do Oriente Médio, da América Latina e do Norte da África (15).

De acordo com a OMS, fatores como mudanças climáticas, conflitos armados e migração têm contribuído para a expansão da leishmaniose em regiões anteriormente não endêmicas (16). O controle global da doença é desafiado pela falta de acesso ao tratamento em áreas endêmicas e pela resistência do parasito aos medicamentos, o que demanda esforços internacionais para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle (17).

O Brasil é um dos países mais afetados pela LTA, especialmente pela forma visceral, que é a mais grave e pode ser fatal se não tratada (18). Entre 2017 e 2021, o país registrou uma média de 3.500 a 4.000 casos anuais de leishmaniose visceral, com maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste (18). No entanto, a leishmaniose cutânea é ainda mais frequente, afetando cerca de 20.000 pessoas por ano em diversas regiões (19).

Essa alta prevalência é atribuída a fatores como o desmatamento, a expansão agrícola, a urbanização desordenada e a migração populacional para áreas endêmicas (20). O controle da doença no Brasil enfrenta desafios adicionais, como a falta de diagnóstico precoce e o tratamento insuficiente, o que contribui para a perpetuação dos ciclos de transmissão e o aumento dos casos (21).

No estado do Amazonas, a leishmaniose cutânea é particularmente prevalente (21). Essa forma de LTA está associada ao ecossistema amazônico, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos vetores flebotomíneos (21). Estudos mostram que a leishmaniose cutânea representa mais de 90% dos casos notificados no estado, com aumento nos últimos anos devido ao desmatamento e à ocupação de áreas florestais para atividades agrícolas (21).

Além disso, as populações indígenas e ribeirinhas, que vivem em regiões isoladas e com acesso limitado aos serviços de saúde, são particularmente vulneráveis (20). As dificuldades no controle da doença no Amazonas incluem

barreiras geográficas, falta de infraestrutura de saúde e limitações no acesso ao diagnóstico e ao tratamento adequados (21).

1.2 Agente etiológico e ciclo biológico

A LTA é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresentando um ciclo biológico complexo que envolve múltiplos agentes e etapas distintas (22). (**Figura 3**).

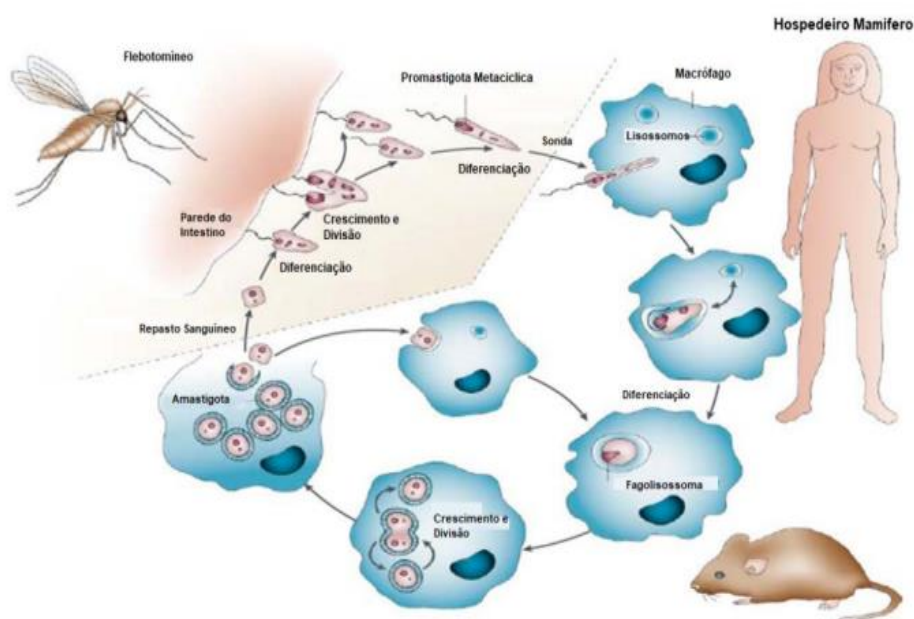


Figura 3. Ciclo biológico da *Leishmania*. Fonte: Sacks, 2002 (23).

No estado do Amazonas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta elevada diversidade de espécies do gênero *Leishmania*, com predominância do subgênero *Viannia* (24). Entre as espécies mais prevalentes, destacam-se *Leishmania (Viannia) guyanensis* como a principal agente etiológico, seguida por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, padrão amplamente observado na Amazônia brasileira (25,26). Outras espécies, como *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, também são identificadas, embora com menor frequência (25).

No contexto específico de Manaus, estudos epidemiológicos demonstram igualmente o predomínio de *Leishmania (V.) guyanensis*, refletindo o padrão observado no restante do estado (27). A urbanização crescente e a proximidade

com áreas de floresta favorecem a adaptação dos vetores ao ambiente periurbano, sustentando a transmissão da doença (27,28). Além disso, a presença de outras espécies, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, embora menos frequente, possui relevância clínica, podendo influenciar na resposta terapêutica e na evolução dos casos (29).

Dessa forma, o conhecimento da distribuição das espécies em Manaus e no Amazonas é essencial para o aprimoramento das estratégias de diagnóstico, controle e manejo da LTA (27,28), pois a diversidade de espécies está associada à complexidade ecológica da região amazônica, envolvendo múltiplos vetores flebotomíneos e reservatórios silvestres, o que contribui para a manutenção do ciclo de transmissão e para a variabilidade clínica da doença. (27)

Para a compreensão da dinâmica da doença, é essencial explorar tanto o agente etiológico quanto seu ciclo de vida (30). Os principais vetores da leishmaniose são insetos dípteros da família *Psychodidae*, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como flebotomíneos ou “mosquito-palha”. (30)

No Brasil, os gêneros mais importantes são *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo), (26,31,32) sendo o primeiro responsável pela transmissão das espécies de *Leishmania* nas Américas. Entre os vetores de maior relevância epidemiológica na região amazônica, destacam-se *Lutzomyia umbratilis*, principal transmissor de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e *Lutzomyia flaviscutellata*, associada à transmissão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (32,33).

Esses insetos apresentam hábitos crepusculares e noturnos e elevada adaptação a ambientes florestais, embora algumas espécies também sejam encontradas em áreas periurbanas, favorecendo a aproximação com o homem (30,33). A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada, que inocula formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro, mantendo o ciclo entre reservatórios animais e humanos (30,31). O ciclo biológico desse parasita envolve uma relação entre o vetor e seu hospedeiro, que pode ser tanto humano quanto animal (33).

Nesse sentido, quando o mosquito infectado realiza a transmissão para o hospedeiro, deposita o parasita, que posteriormente invade células do sistema imunológico, especialmente os macrófagos (33). À medida que as formas amastigotas se multiplicam, os macrófagos se rompem, liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos, transformando essas células em locais de replicação (33).

No ciclo biológico da *Leishmania*, a transformação do parasita é um processo complexo e crucial para sua sobrevivência no ambiente intracelular dos hospedeiros vertebrados (34). Após a inoculação pelo flebotomíneo, as formas promastigotas enfrentam um ambiente desafiador ao migrarem para os macrófagos, células responsáveis pela fagocitose de patógenos (33).

Dentro dos macrófagos, ocorre a transformação dos promastigotas em amastigotas, uma adaptação necessária para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e garantir sua replicação e persistência (34). Esse processo intracelular não apenas sustenta a infecção, mas também desencadeia respostas inflamatórias e imunológicas que caracterizam a patogênese da leishmaniose (35).

Quando um flebotomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo, injetando formas promastigotas de *Leishmania* na pele do hospedeiro, essas formas, móveis e flageladas, são rapidamente fagocitadas por células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos (36). Dentro dessas células, o ambiente ácido dos fagolisossomos induz a transformação dos promastigotas em amastigotas, uma forma não flagelada, adaptada ao ambiente intracelular e resistente às enzimas lisossômicas do hospedeiro. As amastigotas se multiplicam por divisão binária no interior dos fagolisossomos dos macrófagos (36).

Esse processo de multiplicação causa a destruição gradual dos macrófagos infectados, liberando amastigotas que podem infectar novas células e propagar a infecção (37). A capacidade dessas formas de resistirem ao ambiente hostil dos fagolisossomos e de modular as respostas imunes permite

que o parasita evite sua eliminação, favorecendo a manutenção da infecção crônica (37).

Adicionalmente, a interação da *Leishmania* com os macrófagos não se limita à replicação intracelular; ela também influencia a resposta imunológica do hospedeiro (38). A infecção pode resultar em um desequilíbrio do sistema imune, com supressão de respostas celulares específicas essenciais para o controle da infecção (38).

As amastigotas podem persistir no hospedeiro por períodos prolongados, mesmo em pacientes tratados, devido à sua capacidade de se abrigarem em células do sistema imunológico (38). Em casos de leishmaniose visceral, o parasita pode disseminar-se para órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea, onde causa inflamação crônica e danos teciduais (39). Essa persistência contribui para a cronicidade da infecção e para as dificuldades no tratamento completo da doença (39).

Por fim, o entendimento do agente etiológico e do ciclo biológico do parasita é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e prevenção (40). Compreender as interações entre parasita, hospedeiro e vetor permite direcionar medidas preventivas, como o controle de vetores e o tratamento precoce dos casos diagnosticados (40).

1.3 Formas clínicas

A forma cutânea da LTA é a manifestação mais comum da doença, sendo caracterizada por lesões ulcerativas na pele, geralmente nos locais da picada do flebotomíneo (41). As lesões iniciam-se como pápulas ou nódulos eritematosos, que podem evoluir para úlceras com bordas elevadas e fundo granuloso (41) (Figura 4). Em muitos casos, são indolores, mas podem se complicar com infecções bacterianas secundárias (42). A cicatrização pode ocorrer de forma espontânea após alguns meses, porém frequentemente deixa cicatrizes desfigurantes (42).

A forma cutânea da LTA é comum na América Latina e na Ásia, sendo espécies como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* associadas a essa apresentação clínica (43).

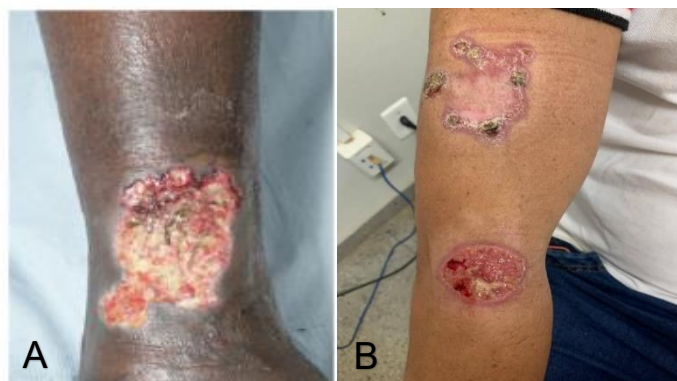


Figura 4. Leishmaniose tegumentar americana – forma cutânea. (A) Úlcera de pioderma gangrenoso com margens irregulares; (B) Lesão ulcerada crostosa, localizada no braço direito, com área cicatricial acima. Fonte: (44, 45).

A forma disseminada da LTA é uma apresentação rara e mais grave da leishmaniose cutânea, caracterizada pela presença de múltiplas lesões espalhadas por diversas partes do corpo, incluindo face, tronco e membros (46). Esse tipo de doença está associado principalmente a infecções por *L. (V.) braziliensis* e ocorre com maior frequência em áreas endêmicas da América Latina, como Brasil e Peru (47).

A disseminação das lesões deve-se a uma resposta imune ineficaz, que permite a propagação do parasita pelo organismo (47). Dessa forma, pacientes com a forma disseminada podem apresentar dezenas de lesões, sendo essa manifestação também caracterizada pela dificuldade no tratamento e por altas taxas de recidiva (48).

A forma difusa da LTA, também conhecida como leishmaniose cutânea anérgica, é caracterizada pela presença de nódulos e placas extensas na pele, sem tendência à ulceração (49). Essas lesões são difusas e simétricas, podendo acometer face, membros e tronco (49). Esse tipo de LTA está associado a uma resposta imunológica altamente deficiente contra o parasita, resultando na ausência de controle da infecção e na disseminação do agente na pele (50).

A espécie *L. (L.) amazonensis* é frequentemente associada à forma difusa, que ocorre principalmente na América do Sul (51). Essa forma da doença é crônica, de difícil tratamento e apresenta altas taxas de recidiva após a terapia (52).

A forma mucocutânea da LTA é uma apresentação grave e desfigurante, caracterizada pelo comprometimento das mucosas das vias aéreas superiores, como nariz, boca e garganta, geralmente após uma infecção cutânea inicial (53). Inicialmente, a doença manifesta-se por lesões cutâneas; entretanto, após meses ou até anos, o parasita pode disseminar-se para as mucosas, causando ulcerações destrutivas que comprometem estruturas como o nariz, o palato e a faringe (54). Essa forma é mais comum na América Latina e frequentemente associada a *L. (V.) braziliensis* (55). Devido à gravidade das lesões e ao potencial de desfiguração, o tratamento é complexo e pode exigir intervenções cirúrgicas e terapias prolongadas (55).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose baseia-se no julgamento clínico, considerando informações epidemiológicas da região, associado a métodos laboratoriais, como a identificação direta do parasita por meio de microscopia ou cultura (56,57). O diagnóstico da LTA exige precisão e sensibilidade, pois envolve a avaliação de diversos fatores, desde os sintomas clínicos até o histórico do paciente e a região geográfica de origem (58). Em crianças, os sinais podem ser sutis, com febre persistente e mal-estar geral; já em adultos, as manifestações cutâneas ou viscerais tendem a ser mais evidentes (58).

A microscopia continua sendo o método mais aceito para a observação de amastigotas em amostras de pele ou mucosa, sendo considerada o padrão ouro. Entretanto, a microscopia apresenta limitações importantes que podem comprometer sua acurácia diagnóstica (59). Outros métodos, como a caracterização por meio de anticorpos, são onerosos e exigem maior tempo para obtenção de resultados (60), prejudicando a coleta precisa de dados epidemiológicos e o controle da doença.

O diagnóstico da LTA é um processo crucial que envolve diversas etapas e técnicas, visando identificar a presença do parasita *Leishmania* no organismo do paciente (61). Inicialmente, a suspeita clínica é levantada com base nos sintomas apresentados. Algumas formas da doença podem apresentar lesões cutâneas, febre prolongada, perda de peso, entre outros sinais; no entanto, devido à semelhança com outras doenças, é essencial a realização de exames específicos para confirmação da infecção (61).

Uma das técnicas mais utilizadas é a análise microscópica direta (62). Esse método envolve a coleta de amostras de tecido, como aspirados de linfonodos, medula óssea ou lesões cutâneas, que são posteriormente examinadas ao microscópio (62), sendo a presença de formas amastigotas no interior das células hospedeiras um indicativo claro da infecção. Embora seja um método simples e de baixo custo, sua sensibilidade pode variar, especialmente em casos de infecção crônica ou em áreas endêmicas (62).

Outro método diagnóstico é a cultura de parasitas, na qual as amostras coletadas são incubadas em meios específicos para o crescimento de *Leishmania* (63). Esse procedimento permite a identificação do parasita em casos nos quais a microscopia direta não foi conclusiva (63). Apesar de ser mais sensível, a cultura requer infraestrutura laboratorial adequada e pode levar semanas para fornecer resultados, atrasando o início do tratamento (63).

A principal limitação da PCR (*polymerase chain reaction*) é o custo e a necessidade de equipamentos especializados, o que pode restringir seu uso em áreas com recursos limitados (64). Entretanto, sua utilização no diagnóstico da LTA traz benefícios significativos para o manejo da doença, especialmente em regiões endêmicas, onde pode ser confundida com outras enfermidades infecciosas. Nesses casos, a PCR oferece maior precisão diagnóstica, auxiliando na escolha adequada do tratamento (65). Isso é fundamental, pois a escolha inadequada de medicamentos pode ser ineficaz e contribuir para o desenvolvimento de resistência (65). Assim, a PCR torna-se uma ferramenta valiosa tanto para o diagnóstico quanto para a gestão em saúde pública (62).

Além disso, a aplicação da PCR pode ser ampliada por meio de inovações tecnológicas e estratégias de financiamento (57). Projetos de saúde global têm investido em versões portáteis e mais acessíveis dos equipamentos necessários, visando ampliar a capacidade diagnóstica em áreas remotas (66). Iniciativas de financiamento e colaboração internacional podem contribuir para superar barreiras financeiras, permitindo que mais comunidades tenham acesso a essa tecnologia (66). Outro fator que dificulta o diagnóstico é a idade do paciente, uma vez que influencia a escolha dos testes e a interpretação dos resultados, devido às variações do sistema imunológico ao longo da vida (69).

Portanto, o diagnóstico da LTA é um processo complexo e multifacetado, que exige uma abordagem cuidadosa e adaptada às especificidades de cada caso, a fim de garantir que o tratamento seja iniciado de forma correta, rápida e eficaz (69). A escolha do método diagnóstico mais adequado depende de diversos fatores, incluindo o tipo de leishmaniose, a disponibilidade de recursos, a infraestrutura laboratorial e os dados epidemiológicos (69).

Nenhuma das metodologias citadas permite a identificação precisa das espécies de *Leishmania*. Em razão disso, foram desenvolvidas técnicas específicas, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), tipagem por sequenciamento multilocus e espectrometria de massa (70,71,72). O padrão ouro para identificação de espécies, segundo a OMS, é o MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), que exige o cultivo do parasita (56,73). Entretanto, o cultivo *in vitro* de *Leishmania* é complexo e pode gerar resultados inconsistentes entre diferentes grupos de pesquisa. Diante dessas limitações, surgiu a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular mais eficientes (74).

A PCR em tempo real, ou quantitativa (qPCR), destaca-se por sua rapidez, dinamismo e menor risco de contaminação (3,54). Essa técnica utiliza emissão de fluorescência durante a amplificação, tornando-se altamente específica para alvos genéticos e reduzindo a ocorrência de resultados falso-positivos (75).

A tecnologia TaqMan™ permite a quantificação de DNA e a detecção simultânea de múltiplos alvos na mesma reação, por meio de sondas específicas que emitem fluorescência após clivagem pela polimerase (76). As plataformas de PCR apresentam alta sensibilidade, variando entre 92% e 100% (2,7,49,51), e especificidade entre 84% e 100% (57), superando os cerca de 63,5% de sensibilidade observados na microscopia (77). Já a cultura apresenta sensibilidade variável e, muitas vezes, inferior, devido às dificuldades do cultivo *in vitro*.

Considerando que a leishmaniose afeta principalmente populações vulneráveis, frequentemente residentes em áreas rurais remotas, com moradias precárias e acesso limitado aos serviços de saúde (78), tornam-se necessárias alternativas diagnósticas mais acessíveis.

Nesse contexto, métodos como a impressão em papel de filtro (*press imprint smear* ou *imprint*) destacam-se (78). Trata-se de um procedimento de baixo custo, de fácil execução no ponto de atendimento e que dispensa anestesia, cirurgia e hospitalização. Assim, a aplicação da PCR em amostras de papel de filtro constitui uma alternativa sensível e específica aos métodos tradicionais, nos quais a biópsia é geralmente o material mais utilizado (79).

Portanto, o diagnóstico ideal da LTA baseia-se na combinação de métodos clínicos e laboratoriais, garantindo a confirmação da presença do parasita de forma precisa e eficiente (67).

1.5 Gene ITS1

O ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) é uma região altamente variável do DNA ribossômico, localizada entre os genes que codificam o RNA ribossômico 18S e 5.8S. No diagnóstico da LTA, o ITS1 é útil na identificação e diferenciação de subgêneros de *Leishmania* (80). Esse alvo apresenta sequências repetidas com pontos polimórficos capazes de discriminar espécies (81). Além disso, esse marcador pode ser utilizado para distinguir os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (82). A variabilidade dessa região permite distinções

precisas entre diferentes espécies, aspecto essencial para o diagnóstico e o tratamento eficaz da doença (80).

O uso de métodos moleculares, como a PCR, para amplificar a região *ITS1* tem revolucionado a capacidade de detectar e identificar *Leishmania* em amostras clínicas. Essa técnica pode ser comparada a um microscópio de alta precisão, capaz de revelar detalhes moleculares não visíveis por métodos convencionais (83).

Com a amplificação da região *ITS1*, obtém-se um “retrato” molecular das espécies presentes, possibilitando diagnósticos mais rápidos e precisos, o que é fundamental para o início de tratamentos específicos, seguros e eficazes (83). A identificação de subgêneros em parasitas do gênero *Leishmania* é essencial para o diagnóstico, tratamento e controle epidemiológico da LTA, uma vez que diferentes subgêneros estão associados a manifestações clínicas distintas e respondem de maneira variável aos tratamentos (83). O *ITS1* é amplamente utilizado para essa diferenciação devido à sua variabilidade genética associada a regiões conservadas entre espécies próximas (84).

O gene *ITS1* tem sido empregado em métodos de biologia molecular, incluindo reações de sequenciamento, para distinguir subgêneros (85). Outro aspecto importante é que a PCR com iniciadores específicos para a região *ITS1* permite a amplificação de fragmentos com tamanhos característicos, facilitando a identificação rápida e precisa (86).

Além disso, a análise do *ITS1* não apenas facilita a identificação de subgêneros, mas também contribui para o estudo da epidemiologia da LTA, fornecendo informações relevantes sobre a distribuição geográfica e a diversidade genética das populações do parasita (87). Esses dados são fundamentais para a implementação de estratégias de controle, direcionando esforços para áreas de maior risco e permitindo a adaptação das intervenções às particularidades locais (87).

Consequentemente, ao identificar padrões de distribuição das diferentes espécies de *Leishmania*, é possível prever surtos e monitorar a eficácia das

medidas de controle (87). Por exemplo, a detecção de variantes com possível resistência a tratamentos em uma região específica pode levar ao fortalecimento da vigilância e ao ajuste das estratégias terapêuticas (87).

Ademais, a análise do *ITS1* pode auxiliar na detecção de surtos emergentes em regiões anteriormente consideradas livres da doença (73), bem como no monitoramento da expansão para novas áreas, influenciada pelo aumento da mobilidade humana e pelas mudanças climáticas, que favorecem a dispersão dos vetores da LTA (88). Assim, a identificação rápida das espécies envolvidas permite respostas mais ágeis, com adequação das medidas preventivas e terapêuticas conforme as características epidemiológicas de cada espécie (89).

O gene *ITS1* também contribui para estudos filogenéticos mais abrangentes, permitindo a análise das relações evolutivas entre diferentes espécies de *Leishmania* (90). Dessa forma, o uso dessa região genética representa um avanço significativo no diagnóstico molecular, na caracterização epidemiológica e no apoio às estratégias de saúde pública (91).

1.6 Gene *HSP70*

O gene *HSP70* (*heat shock protein 70*) codifica uma proteína pertencente à família das proteínas de choque térmico, essenciais para a sobrevivência celular sob condições de estresse e variações de temperatura (92). Esse gene é amplamente empregado em técnicas moleculares, como PCR e sequenciamento, para a identificação e distinção de espécies de parasitas, incluindo *Leishmania* (92).

A região central do gene *HSP70* apresenta variabilidade suficiente para permitir a diferenciação entre as principais espécies do gênero *Leishmania*, especialmente aquelas dos complexos *L. (L.) donovani* (causador da leishmaniose visceral) e *L. (L.) mexicana* (associado à leishmaniose cutânea, entre outras formas clínicas da doença) (93). Diferentes estudos também aplicam técnicas de PCR-RFLP ao gene *HSP70*, permitindo a obtenção de perfis específicos para cada espécie de *Leishmania* e auxiliando na identificação em amostras clínicas (94).

A caracterização molecular de espécies de *Leishmania* utilizando o *HSP70* apresenta grande relevância epidemiológica, pois possibilita a identificação precisa das espécies em áreas endêmicas, sendo essencial para o controle da doença e o planejamento de estratégias de saúde pública (95). Essa caracterização também contribui para o diagnóstico diferencial das formas clínicas da leishmaniose e para a compreensão das particularidades de cada espécie em termos de patogenicidade e resposta ao tratamento, favorecendo o manejo adequado da doença (96).

Portanto, a escolha desse alvo está relacionada às suas diferentes aplicações e objetivos. O *HSP70* apresenta sequências úteis para a identificação de espécies (97), incluindo uma região polimórfica de aproximadamente 234 pb (pares de bases), com capacidade de discriminar espécies de *Leishmania* associadas à LTA (98).

Diante do panorama descrito, os desafios relacionados à ampla diversidade genética das espécies de *Leishmania* na Amazônia brasileira, que coexistem e causam leishmaniose cutânea (LC) (99), são de grande interesse científico. Nesse contexto, é fundamental promover avanços tecnológicos em biologia molecular nos serviços de referência, de modo a superar as limitações do diagnóstico tradicional, tornando-o não apenas seguro, rápido, sensível, específico e quantitativo, mas também capaz de caracterizar as espécies presentes nas amostras. Essa capacidade é crucial para o tratamento eficaz e oportuno, contribuindo para a redução de custos em saúde pública.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a aplicação de um novo protocolo de qPCR baseado em sondas TaqMan™, desenvolvido *in house*, com capacidade de identificar subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) e espécies (*L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*), utilizando os genes *ITS1* e *HSP70*, respectivamente. Além disso, foram avaliadas as diferenças de sensibilidade na identificação de subgêneros e espécies, comparando diferentes tipos de amostras (biópsia e papel de filtro), com o objetivo de definir uma abordagem diagnóstica mais sensível para a LTA, por meio de métricas de validação.

2.JUSTIFICATIVA

A técnica de qPCR tem se destacado como uma ferramenta de grande importância na identificação e detecção de *Leishmania*. Sua precisão, sensibilidade e rapidez a tornam essencial para a pesquisa e o diagnóstico dessa infecção. A aplicação da qPCR na identificação de doenças parasitárias tem sido fundamental para aprimorar o diagnóstico e orientar o tratamento adequado, devido à sua capacidade de detectar e quantificar com precisão o DNA dos parasitas, incluindo os do gênero *Leishmania*.

A qPCR, como metodologia para identificação de espécies, oferece uma ferramenta que supera limitações de métodos tradicionais, como exames sorológicos e microscopia, atualmente considerados padrão ouro segundo a OMS. A identificação de espécies por meio da qPCR também fornece informações relevantes sobre a epidemiologia da doença e sua distribuição em áreas endêmicas, o que é fundamental para a implementação de medidas de controle e prevenção.

No que se refere às manifestações clínicas, que estão diretamente relacionadas ao agente etiológico, a correta identificação da espécie proporciona avanços significativos na escolha do tratamento mais adequado para o paciente, além de contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas terapias e fármacos.

Embora a biologia molecular tenha avançado consideravelmente nos últimos anos, ainda não há consenso quanto ao uso de marcadores moleculares padronizados para o diagnóstico da LTA, o que dificulta o desenvolvimento de um ensaio único capaz de determinar simultaneamente a carga parasitária e a identificação da espécie de *Leishmania*.

A diversidade genética dos parasitas e a variabilidade dos métodos moleculares constituem alguns dos principais obstáculos. Cada marcador molecular como genes, regiões conservadas, regiões polimórficas, sequências repetitivas ou outras regiões genômicas apresenta vantagens e limitações. Diante disso, a combinação de diferentes ensaios pode ser uma estratégia eficaz para maximizar a acurácia do diagnóstico molecular.

A tecnologia de sondas utilizada neste estudo, TaqMan™, caracteriza-se por permitir, além da quantificação precisa de DNA, a detecção simultânea de múltiplos alvos na mesma reação, por meio do uso de sondas específicas para diferentes regiões gênicas de distintas espécies.

Por fim, a qPCR representa uma ferramenta de grande valor na identificação e detecção de *Leishmania*. Sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez não apenas aumentam a precisão diagnóstica, mas também têm o potencial de orientar o tratamento adequado e melhorar a eficácia terapêutica.

Diante do exposto e em consonância com os avanços da biologia molecular, este estudo teve como objetivo desenvolver novos alvos moleculares utilizando a qPCR, *in house*, em um serviço de referência em doenças dermatológicas e tropicais. A proposta visa proporcionar um diagnóstico seguro, rápido, sensível e específico, além de permitir a identificação da espécie presente na amostra, o que é fundamental para a escolha do tratamento mais eficaz, considerando que algumas espécies de *Leishmania* não respondem adequadamente ao tratamento de primeira linha, sendo necessária a utilização de outros fármacos.

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver e validar um painel de qPCR para o diagnóstico molecular e a identificação de espécies de *Leishmania*, comparando a eficácia em amostras de biópsia e papel de filtro.

3.2 Específicos

1. Elaborar um algoritmo com novos alvos moleculares para determinação do subgênero e espécies causadoras da LTA;
2. Analisar a melhor amostra biológica (biópsia e papel de filtro) na identificação de espécies;
3. Comparar a acurácia entre os testes moleculares e o exame direto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios estabelecidos na Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM), sob o CAAE: 54683621.8.0000.0002. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Apenas pacientes maiores de idade foram incluídos. A estrutura da pesquisa seguiu as diretrizes para o relato de estudos de acurácia diagnóstica (STARD – *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies*) (100).

4.2 Cepas de Referências

As cepas de referência estavam conservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e foram cedidas para este estudo. As cepas foram reativadas em meio bifásico a 28 °C, constituído por fase sólida composta por sangue de coelho e BHI-ágar (*Brain Heart Infusion Agar*) [meio Novy–Nicolle–McNeal (NNN)] e, na fase líquida, por meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (FBS).

A viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica, considerando a motilidade dos parasitas. Para a análise de validação do ensaio por qPCR, seis cepas de *Leishmania* foram analisadas. (**Tabela 1**).

Tabela 1. Espécies utilizadas como cepas de referência no estudo.

Espécies	Código internacional	País	Teste
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	Brasil	qPCR Padronização
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHO/BR/1975/M2903	Brasil	qPCR Padronização
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533	Brasil	qPCR Padronização
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426	Brasil	qPCR Padronização
<i>L. (V.) shawi</i>	MCEB/BR/1984/M8408	Brasil	qPCR Padronização
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8	Brasil	qPCR Padronização
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TcIV	Brasil	Inclusão e exclusão
<i>Trypanosoma rangeli</i>	AM193	Brasil	Inclusão e exclusão
<i>Plasmodium vivax</i>	SAL-1	Brasil	Inclusão e exclusão
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Ss54	Brasil	Inclusão e exclusão

4.3 Amostras clínicas

Este estudo foi realizado por conveniência. O recrutamento e a coleta dos materiais biológicos ocorreram entre 2021 e 2025 na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM) e na Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), ambas localizadas em Manaus, Amazonas, Brasil. Nessas unidades de saúde, todos os indivíduos maiores de idade que se apresentaram com lesões cutâneas ou mucosas sugestivas de leishmaniose foram identificados, incluídos e submetidos ao exame parasitológico direto (microscopia).

Essa técnica consistiu na escarificação e preparação de esfregaços da borda interna da úlcera ou da superfície de lesões fechadas em lâminas coradas. O critério para definição de amostras positivas ou negativas foi a visualização, ou não, de formas amastigotas, seguindo as diretrizes diagnósticas padrão para leishmaniose. As lâminas foram coradas pelo método panótico e examinadas por um parasitologista experiente, sob microscopia óptica com aumento de 1000×, utilizando óleo de imersão, sendo avaliados, no mínimo, 100 campos microscópicos antes da classificação de uma amostra como negativa.

Para minimizar vieses, a leitura das lâminas foi realizada por um avaliador cego aos resultados da qPCR e às informações clínicas dos pacientes; entretanto, os executores da qPCR tinham conhecimento dos resultados da microscopia. O exame parasitológico direto foi adotado como padrão-ouro devido à sua ampla disponibilidade, baixo custo e rapidez em ambientes clínicos de rotina na região de estudo, representando o método diagnóstico de referência na prática clínica local para leishmaniose cutânea.

É importante destacar que a coleta das amostras para o teste índice (qPCR, a partir de biópsias ou papel de filtro) e para o padrão de referência (microscopia, por exame direto) não ocorreu de forma concomitante, em razão das diferentes naturezas dos procedimentos envolvidos. Não foram observados eventos adversos significativos associados aos procedimentos de coleta ou à realização dos testes microscópicos e moleculares durante o estudo.

Na área escarificada, foi pressionado um papel de filtro estéril (NucleoCard for Blood Storage – MACHEREY-NAGEL®) para absorção do material da lesão.

Cada papel de filtro foi devidamente identificado e recebeu de dois a quatro pontos de coleta (*imprint*). Para a obtenção da biópsia da borda da lesão, o clínico responsável aplicou anestesia local com 0,3 mL de cloridrato de lidocaína a 2%. Em seguida, um fragmento de 4 mm de tecido foi coletado com o uso de punch. O material foi armazenado em microtubos de 1,5 mL contendo solução fisiológica e encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da FUHAM.

4.4 Extração de DNA

O kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) foi utilizado para a extração de DNA a partir de cepas de referência e de amostras clínicas (biópsias e papel de filtro), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e a pureza foi avaliada pelo cálculo da razão 260/280, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific™).

4.5 Seleção dos alvos moleculares

Para determinar a performance analítica da qPCR, dois marcadores moleculares amplamente empregados no diagnóstico da leishmaniose foram selecionados: os genes *ITS1* e *HSP70*. Um total de 146 isolados foi utilizado para o desenho dos sistemas, com base em sequências genéticas obtidas do GenBank (**Tabelas S1 e S2**).

O alinhamento das sequências, realizado com o software MEGA 11, permitiu a identificação de regiões conservadas e polimórficas necessárias para o desenvolvimento dos novos sistemas moleculares.

4.6 Desenho de Primers e sondas

O software Primer3Plus (v. 0.4.0) foi utilizado para avaliar a temperatura de melting (T_m), o conteúdo de %GC, a formação de autodímeros, *hairpins*, heterodímeros, sequências repetitivas e a energia livre de Gibbs (ΔG). Em seguida, foi selecionada uma região curta (10–20 nucleotídeos) específica para o desenho das sondas.

O software Primer Express™ v. 3.0 (Applied Biosystems, CA, EUA) foi utilizado para avaliar a T_m , o conteúdo de %GC e possíveis incompatibilidades nas regiões candidatas, considerando o uso de sondas com cauda MGB (*Minor Groove Binder*).

4.7 Análise *in silico* dos alvos moleculares selecionados

Os *primers* desenvolvidos foram avaliados por PCR *in silico* e verificados quanto à especificidade utilizando o programa Primer-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (101). As sequências dos *primers* e das sondas foram comparadas com os nucleotídeos depositados no NCBI por meio do BLASTn (*Nucleotide BLAST*), para confirmação da especificidade em relação às espécies.

4.8 Otimização da qPCR

Diferentes combinações de concentrações de *primers* e sondas foram testadas para a definição do protocolo final (**Tabela S3**). A qPCR *singleplex* foi realizada em volume final de 10 μL , contendo 5 μL de TaqMan™ Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (2 \times) (Applied Biosystems), 0,3 μL de cada *primer*, 0,1 μL de sonda, 2,3 μL de água livre de nucleases (*nuclease-free water*) e 2 μL de DNA, na concentração de 25–50 ng/ μL .

As sondas do tipo TaqMan™ foram sintetizadas pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), na concentração de 6000 pmol (1 \times TE/100 pmol). As sondas apresentavam fluoróforos FAM (~518 λ_{max} /nm) ou VIC (~554 λ_{max} /nm) na extremidade 5' e eram conjugadas com MGB (*Minor Groove Binder*) na extremidade 3' (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os experimentos. Em cada placa de reação, dois poços continham 2 μL de água ultrapura no lugar da amostra, sendo considerados controles negativos. Os controles positivos foram compostos por um *pool* de cepas de *Leishmania*, testadas em duplicata.

A otimização e validação dos ensaios foram realizadas utilizando o sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems). O perfil de ciclagem consistiu

em 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, durante 40 ciclos. Para cada amostra, o gene β -actina foi utilizado como controle interno (101).

As amostras foram consideradas positivas quando a curva de amplificação ultrapassou o limiar (*threshold*), definido em 0,02, conforme configuração padrão do software do sistema StepOne Plus. Esse valor foi previamente validado pela equipe durante os experimentos de otimização, com base na análise da linha de base das curvas de amplificação, resultando na determinação do valor de Ct (*threshold cycle*). As amostras foram consideradas negativas quando não apresentaram amplificação acima do limiar estabelecido.

4.9 Curva padrão

A carga parasitária foi estimada utilizando uma quantidade conhecida de DNA genômico extraído de culturas de promastigotas de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (**Tabela 1**). O cálculo baseou-se na massa de DNA equivalente a um parasita, estimada em aproximadamente 32 Mb (91,92,93), acrescida de 15,8% correspondente ao DNA do cinetoplasto (kDNA) (94). Os detalhes dos cálculos estão apresentados na **Tabela S4**.

A diluição seriada (1:10) variou de 10^7 a 10^2 cópias para a construção das curvas padrão, conforme estabelecido na etapa de otimização. Para todos os alvos, a curva padrão foi construída com cinco pontos de concentração de DNA, realizados em triplicata.

A eficiência da amplificação (ϵ) e o coeficiente de correlação (R^2) foram calculados a partir da inclinação (*slope*) da curva padrão (106,107). O limite de detecção (LOD) da qPCR foi definido como o menor número de cópias detectável pelo ensaio.

4.10 Ensaio de Inclusividade e Exclusividade

O ensaio de inclusividade foi realizado com seis cepas de referência de *Leishmania*, utilizando os marcadores-alvo selecionados. Para a avaliação da especificidade, foram incluídos dois microrganismos da família *Trypanosomatidae*,

filogeneticamente relacionados a *Leishmania*, bem como seis microrganismos associados ao diagnóstico diferencial da leishmaniose.

4.11 Sequenciamento de DNA para o alvo *HSP70*

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems™), em volume final de 20 µL, utilizando os seguintes reagentes: 0,3 µM de cada *primer* — *forward* 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e *reverse* 5'-TCTCGACGCCGGTTG-3' (97) —, 1× Platinum Hot Start PCR Master Mix™ (Thermo Fisher), 5 µL de DNA (10–40 ng) e água ultrapura.

Os fragmentos amplificados (234 pb) foram visualizados em gel de agarose a 2% e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O produto purificado foi submetido à reação de sequenciamento de DNA utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher) e analisado no equipamento Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems™).

As sequências obtidas foram analisadas *in silico* por meio da ferramenta BLAST, para verificação de homologia com sequências de *Leishmania* depositadas no GenBank.

4.12 Análise estatística

Todos os indivíduos elegíveis atendidos entre 2021 e 2025 foram incluídos, buscando maximizar a representatividade da população. Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos a partir de prontuários eletrônicos inseridos no Sistema de Gestão da Saúde Interligada (HYGIA), na FUHAM, e do banco de dados REDCap® (*Research Electronic Data Capture*), na FMT-HVD.

Os dados foram organizados em planilhas do Excel, e a análise estatística foi realizada no software RStudio (v. 4.3.1). Resultados indeterminados para o teste índice (qPCR) ou para o padrão-ouro (microscopia) foram tratados da seguinte forma: a maioria das amostras foi submetida à repetição do ensaio, e uma minoria, que permaneceu inconclusiva ou não pôde ser repetida, foi excluída da análise final. Dados ausentes para variáveis clínicas e epidemiológicas foram excluídos das análises específicas que os utilizavam.

Os parâmetros diagnósticos avaliados incluíram sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. A curva ROC (*receiver operating characteristic*) e a área sob a curva (AUC) foram utilizadas para avaliar a acurácia do novo protocolo molecular para detecção de *Leishmania*. Todas as análises de acurácia diagnóstica e concordância foram pré-especificadas no delineamento do estudo. Essas análises foram realizadas por meio do pacote pROC (RStudio) e do software MedCalc Statistical (v. 20.011).

A concordância entre o novo ensaio e a microscopia foi determinada pelo coeficiente Kappa (κ), com intervalo de confiança (IC) de 95%. A interpretação seguiu a seguinte escala: $\kappa = 0$, ausência de concordância; $\kappa = 0,01-0,20$, concordância fraca; $\kappa = 0,21-0,40$, leve; $\kappa = 0,41-0,60$, moderada; $\kappa = 0,61-0,80$, forte; $\kappa = 0,81-1,00$, quase perfeita (110). Os cálculos foram realizados no software GraphPad. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A concordância entre os sistemas de qPCR com diferentes alvos moleculares foi avaliada por meio da análise de Bland-Altman (Altman & Bland, 1983), utilizando os pacotes *blandr* e *ggplot2* (RStudio). Para essa análise, foram incluídas apenas as 299 amostras que apresentaram resultados positivos para ambos os alvos (*ITS1* e *HSP70*).

Foi avaliada a mediana (Md) de cada sistema de qPCR de acordo com o tipo de amostra biológica, as espécies de *Leishmania* e o local das lesões. Também foram comparados o número de lesões e o tempo de evolução das lesões com os resultados da microscopia. A análise estatística considerou que as amostras eram independentes e não apresentavam distribuição normal (teste de Shapiro–Wilk). Para comparações entre dois grupos, foi aplicado o teste de Mann–Whitney; para múltiplos grupos, o teste de Kruskal–Wallis. A significância estatística em comparações múltiplas foi avaliada após ajuste dos valores de p pelo método de Bonferroni.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para calcular o coeficiente de correlação (r) entre os resultados da qPCR e o tempo e número de lesões.

Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos e análises foram realizados utilizando o pacote ggplot2 (RStudio).

5. RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento dos sistemas de qPCR para detecção de *Leishmania*

O alinhamento das sequências específicas dos genes *ITS1* e *HSP70* tinha o comprimento entre 280-1180 pb e 1007-1380 pb, respectivamente. Os primers foram desenhados em sequências conservadas e as sondas em regiões com variações de nucleotídeos específicas para cada espécie. Desenvolvemos quatro sistemas de qPCR TaqMan™ com capacidade de discriminar subgêneros e espécies (**Tabela 2**).

O sistema qPCR-*ITS1*, composto por dois pares de primers e duas sondas, permitiu o desenvolvimento do sistema VSS (*Viannia Subgenus System*) e LSS (*Leishmania Subgenus System*). Já o qPCR-*HSP70*, composto por um par de primers e duas sondas posicionadas no mesmo *locus*, apresentava variações de nucleotídeos com a capacidade de distinguir as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. Assim, foram desenvolvidos o sistema SSG (*Species Systems for L. (V.) guyanensis*) e SSB (*Species Systems for L. (V.) braziliensis*).

Tabela 2. Sequências dos primers e sondas, alvo e parâmetros da curva padrão.

Alvo	Sistema	Primers sondas	Sequencia (5' – 3')	T _m	%GC	Tamanho fragmento	Fluoróforo	Coefficiente De Determinação	Eficiência da Amplificação
ITS1	VSS	Via - F	GGAGGTGTGTTTTAGCAAG	58 °C	48%	113 pb	VIC/MGB	0.99	86.6%
		Via - R	ATATGTTAACGTCGATCGGC	59 °C	45%				
		Via - S	CACAGATACGCAATACAAT	70 °C	37%				
	LSS	Lei - F	ATGGCCGATCGACGTTATAGC	60 °C	52%	117 pb	FAM/MGB	0.99	95.7%
		Lei - R	AGCCGTTATCCACACACGC	58 °C	58%				
		Lei - S	AATGCCCGTTTCAATAC	68 °C	41%				
HSP70	SSG	Guy - F	AGGCCGACAAGATGCAGC	59 °C	61%	106 pb	VIC/MGB	0.99	86%
		Guy - R	AGTGCCGGACACGTTC	58 °C	61%				
		Guy - S	AAGAACACGATCGCCG	69 °C	56%				
	SSB	Bra - S	TGAAGAACACGGTCC	70 °C	53%		FAM/MGB	0.99	94.5%
ACTB	Actin-Beta	ACTB – F	TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG	64 °C	50 %	57 pb			
ACTB – R	GCATTTGCGGTGGACGAT	63 °C	56 %						
ACTB – S	CGAGTCCGGCCC	62 °C	79 %						

Note: T_m: temperatura de melting. CG: citosina e guanina. F: primer forward. R: primer reverse. S: Sonda. Via: *Viannia*. pb: pares de bases. Lei: *Leishmania*. Guy: *L. (V.) guyanensis*. Bra: *L. (V.) braziliensis*. ITS1: *the internal transcribed spacer*. HSP70: *heat shock protein 70*. ACTB: *actin-beta*.

5.2 Estabilização e eficiência da qPCR

Para padronizar o ensaio singleplex qPCR de cada sistema, o conjunto de primers e sondas foi testado em 12 combinações (**Tabela S3**). As concentrações de 500 nM para ambos os primers e 200 nM para as sondas demonstraram o melhor desempenho para o VSS ($C_t = 17.23 \pm 0.33$) e LSS ($C_t = 17.96 \pm 0.02$). Para o SSG, a melhor performance foi observada com 300 nM de primer *forward*, 500 nM de primer *reverse* e 100 nM de sonda ($C_t = 17.63 \pm 0.02$). Para o SSB, as concentrações ideais foram de 500 nM para o primer *forward*, 300 nM para o primer *reverse* e 200 nM para a sonda ($C_t = 17.58 \pm 0.20$).

O ensaio de linearidade foi conduzido utilizando cepas de referência para cada sistema, a fim de determinar a dinâmica de amplificação: VSS (*L. (V.) guyanensis*), LSS (*L. (L.) amazonensis*), SSG (*L. (V.) guyanensis*) e SSB (*L. (V.) braziliensis*). Para o sistema VSS, desempenho linear e eficiências de amplificação consistentes foram observados com outras espécies do subgênero *Viannia*, como *L. (V.) braziliensis*. A eficiência (ϵ) e o coeficiente de determinação (R^2) mostraram os seguintes valores: VSS ($\epsilon = 86.6\%$; $R^2 = 0.9998$), LSS ($\epsilon = 95.7\%$; $R^2 = 0.9998$), SSG ($\epsilon = 86\%$; $R^2 = 0.9992$) e SSB ($\epsilon = 94.5\%$; $R^2 = 0.9999$) (**Figura 5A-D**). Com base no tamanho do genoma de *Leishmania*, foi calculado o número estimado de parasitas nas amostras. O limite de detecção (LOD) foi de 66 fg (1 cópia) para VSS, LSS e SSG, e de 188 fg (2 cópias) para SSB, sob condições de singleplex.

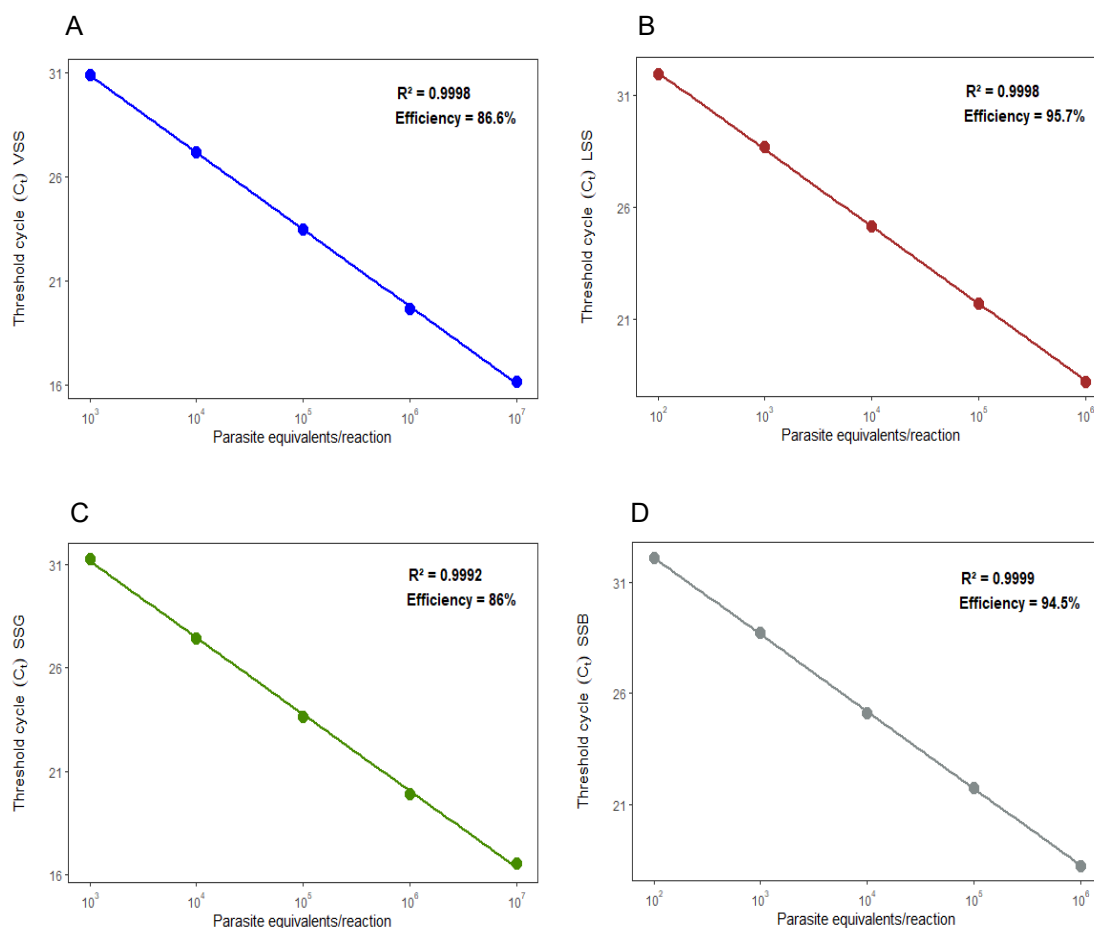


Figura 5. Curvas padrão para sistemas de PCR em tempo real demonstrando a eficiência de amplificação e o coeficiente de determinação (R^2). (A) Sistema VSS (curva azul; cepa de referência *L. (V.) guyanensis*): intervalo de 10^3 a 10^7 equivalentes; $R^2 = 0,9998$; eficiência = 86,6% (B) Sistema LSS (curva marrom; cepa de referência *L. (L.) amazonensis*): intervalo de 10^2 a 10^6 equivalentes; $R^2 = 0,9998$; eficiência = 95,7%. (C) Sistema SSG (curva verde oliva escuro; cepa de referência *L. (V.) guyanensis*): intervalo de 10^3 a 10^7 equivalentes; $R^2 = 0,9992$; eficiência = 86,0%. (D) Sistema SSB (curva cinza ardósia escuro; cepa de referência *L. (V.) braziliensis*): intervalo de 10^2 a 10^6 equivalentes; $R^2 = 0,9999$; eficiência = 94,5%.

5.3 Inclusividade e Exclusividade

O ensaio de inclusividade demonstrou clara discriminação entre as espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, utilizando os sistemas baseados no marcador *ITS1*. Com o marcador *HSP70*, o sistema SSG amplificou

tanto para *L. (V.) guyanensis* quanto para *L. (V.) shawi*. No entanto, o sequenciamento das amostras que amplificaram com o SSG confirmou *L. (V.) guyanensis* como a espécie presente, com 100% de identidade na região alvo sequenciada.

O sistema SSB amplificou para a espécie *L. (V.) braziliensis* (**Tabela S5**). Adicionalmente, observou-se que o sistema SSB amplificou amostras de *L. (V.) lainsoni* ($C_t = 18.5$) e *L. (V.) naiffi* ($C_t = 17.5$). No entanto, o sequenciamento dos amplicons obtidos destas amostras frequentemente demonstrou sequências altamente similares a *L. (V.) braziliensis*, indicando a homologia de sequência na região alvo e uma limitação inerente na discriminação dessas espécies por este sistema isoladamente.

Contudo, em uma análise mais ampla de amostras, observou-se que um pequeno percentual de amostras, especificamente 6 amostras de *L. (V.) lainsoni* (1.7% do total) e 1 amostra de *L. (V.) naiffi* (0.3% do total), identificadas por sequenciamento não apresentaram amplificação pelo sistema SSB. No ensaio de exclusividade, nenhum dos sistemas desenvolvidos apresentou amplificação (**Tabela S5**). No geral, os ensaios moleculares desenvolvidos neste estudo demonstraram ser inclusivos para o gênero *Leishmania*.

5.4 Algoritmo de detecção diferencial: identificação molecular de subgêneros e espécies de *Leishmania*

Um total de 442 pacientes com suspeita clínica de leishmaniose foram incluídos para avaliação molecular, compreendendo 381 amostras de biópsias (86%) e 61 amostras de papel de filtro (14%). Entre os participantes, 80% eram do sexo masculino e 20% do sexo feminino. A idade média foi de 44.10 ± 17.80 anos para mulheres e de 38.47 ± 14.18 anos para homens. No que tange ao exame microscópico basal, 70% ($n=311$) dos participantes apresentaram resultado positivo para leishmania e 30% ($n=131$) resultado negativo.

Quanto às regiões geográficas de origem, os participantes provinham principalmente de BR-174 (23%) e AM-010 (19%). Um total de 41 participantes

(9.3%) eram de localidades específicas como Ramal Pau Rosa, Manaus, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo, e outros 30 (6.7%) eram de outros municípios. As características demográficas e clínicas detalhadas de todos os participantes são sumarizadas na **Tabela S6**. Apesar de a gravidade da doença não ter sido avaliada formalmente com escalas específicas, dados referentes ao número e localização das lesões, bem como às espécies de *Leishmania*, são apresentados para os casos de leishmaniose confirmada. A identificação de espécies foi realizada em duas etapas sequenciais.

Na primeira etapa, utilizando-se o sistema qPCR-*ITS1*, observou-se uma predominância do subgênero *Viannia*, correspondendo a 97% (309/318), enquanto o subgênero *Leishmania* representou 3% (9/318). A segunda etapa, empregando o sistema qPCR-*HSP70*, identificou que 83% (264/318) eram *L. (V.) guyanensis* e 12% (38/318) como *L. (V.) braziliensis*.

Para as amostras com resultado negativo no qPCR-*HSP70* e para as previamente identificadas como subgênero *Leishmania*, a discriminação foi complementada por sequenciamento de DNA (conforme fluxograma na **Figura S1**). Este procedimento revelou que 3% (9/318) dos casos eram de *L. (L.) amazonensis*, 1.7% (6/318) de *L. (V.) lainsoni* e 0.3% (1/318) de *L. (V.) naiffi*. Um total de 124 amostras não apresentaram positividade por nenhum dos métodos moleculares aplicados. Nos 124 pacientes que não apresentaram positividade para leishmaniose (nem por microscopia nem por métodos moleculares), os diagnósticos alternativos mais frequentes incluíram Esporotricose (n=21; 16.94%), Hanseníase (n=13; 10.48%) e Úlcera crônica de pele (n=12; 9.68%). As demais patologias alternativas detectadas nesses pacientes estão detalhadas na **Tabela S7**.

5.5 Avaliação da Confiabilidade Diagnóstica: Métricas de Validação e Curva ROC

As análises consideraram a microscopia como padrão ouro (**Tabela 3**). Os marcadores moleculares demonstraram excelente desempenho diagnóstico: o *ITS1* apresentou sensibilidade de 99.7% (95% IC: 98.2 – 99.99)

e especificidade de 94% (95% IC: 89 – 98). O *HSP70*, por sua vez, revelou sensibilidade de 99.6% (95% IC: 98.2 – 99.99) e especificidade de 95% (95% IC: 89 – 98). O VPP de 98% e VPN de 99% foram observados em ambos os alvos. Esses resultados indicam alta precisão diagnóstica para os marcadores moleculares no contexto investigado. Os cálculos realizados com base na estratificação mostraram que a sensibilidade e a especificidade foram discretamente superiores em biópsias do que em Imprint (**Tabela S8**).

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade da detecção de *Leishmania* por qPCR em comparação com a microscopia.

Teste molecular	Microscopia +	Microscopia -
qPCR <i>ITS1</i> +	310 (99.7%)	08 (6%)
qPCR <i>ITS1</i> -	01 (0.3%)	123 (94%)
Total	311	131
qPCR <i>HSP70</i> +	301 (99.6%)	07 (5%)
qPCR <i>HSP70</i> -	01 (0.4%)	124 (95%)
Total	302	131

Na análise do desempenho diagnóstico, a AUC forneceu uma excelente indicação da acurácia na utilização do ensaio com *ITS1* (AUC = 0.948, 95% IC = 0.91 – 0.977, $p < 0.001$) e *HSP70* (AUC = 0.956, 95% IC = 0.92 – 0.984, $p < 0.004$), conforme a **Figura 6**. Apesar de os resultados da AUC serem superiores em amostras provenientes de papel de filtro (AUC 0.97 para ambos os alvos) do que biópsia (AUC 0.94 a 0.95 para *ITS1* e *HSP70*, respetivamente), não foi observada diferença estatística (**Figura S2**). Isso sugere que o teste tem melhor desempenho em amostras de Imprint; entretanto, o baixo número de amostras de papel de filtro em relação às de biópsia interfere na precisão deste resultado.

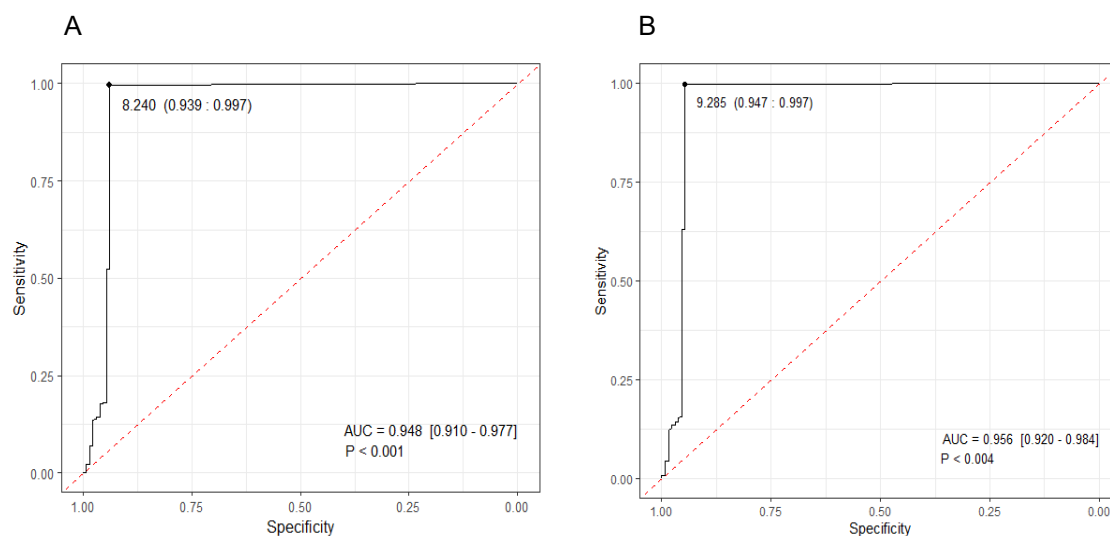


Figura 6. Curvas ROC com suas respectivas AUC. (A) Curva ROC para o alvo *ITS1* com AUC = 0,948 (IC 95%: 0.91 – 0.977; $p < 0,001$). (B) Curva ROC para o alvo *HSP70* com AUC = 0.956 (IC 95%: 0.92 – 0.984; $p < 0,004$).

Os valores do índice Kappa calculados para o *ITS1* e *HSP70* foram de 0.95 (95% IC: 0.92 – 0.98, $p < 0.0000001$) e 0.96 (95% IC: 0.93 – 0.99, $p < 0.0000001$), respectivamente. Isso demonstra uma concordância quase perfeita entre os sistemas moleculares e a microscopia (**Tabela 4**). A mesma análise mostrou que, independentemente da estratificação entre biópsia e imprint, a concordância foi quase perfeita.

Tabela 4. Valores do Índice Kappa em métodos moleculares aplicados a amostras clínicas.

Teste molecular	N	Índice Kappa 95% IC	Valor de p
<i>ITS1</i>	442	0.95 (0.92 – 0.98)	0.0000001
<i>ITS1</i> _biópsia	381	0.95 (0.92 – 0.99)	0.0000001
<i>ITS1</i> _imprint	61	0.93 (0.83 – 1.00)	0.0000001
<i>HSP70</i>	433	0.96 (0.93 – 0.99)	0.0000001
<i>HSP70</i> _biópsia	376	0.96 (0.93 – 0.99)	0.0000001
<i>HSP70</i> _imprint	57	0.93 (0.82 – 1.00)	0.0000001

A análise de Bland-Altman, realizada para comparar a concordância entre os valores dos métodos qPCR- *ITS1* e qPCR- *HSP70*, revelou uma diferença estatística significativa ($p = 3.544e^{-11}$). O viés médio observado foi de 1.14 (DP = 2.87), indicando uma diferença sistemática entre os métodos. A distribuição dos dados no gráfico de Bland-Altman mostrou que a maioria dos pontos não estava agrupada em torno do “0”, reforçando a ideia de que os métodos não concordam (**Figura 7**). Um ponto crítico a ser analisado é que 7 amostras ultrapassaram o limite superior e 10 amostras ultrapassaram o limite inferior de concordância.

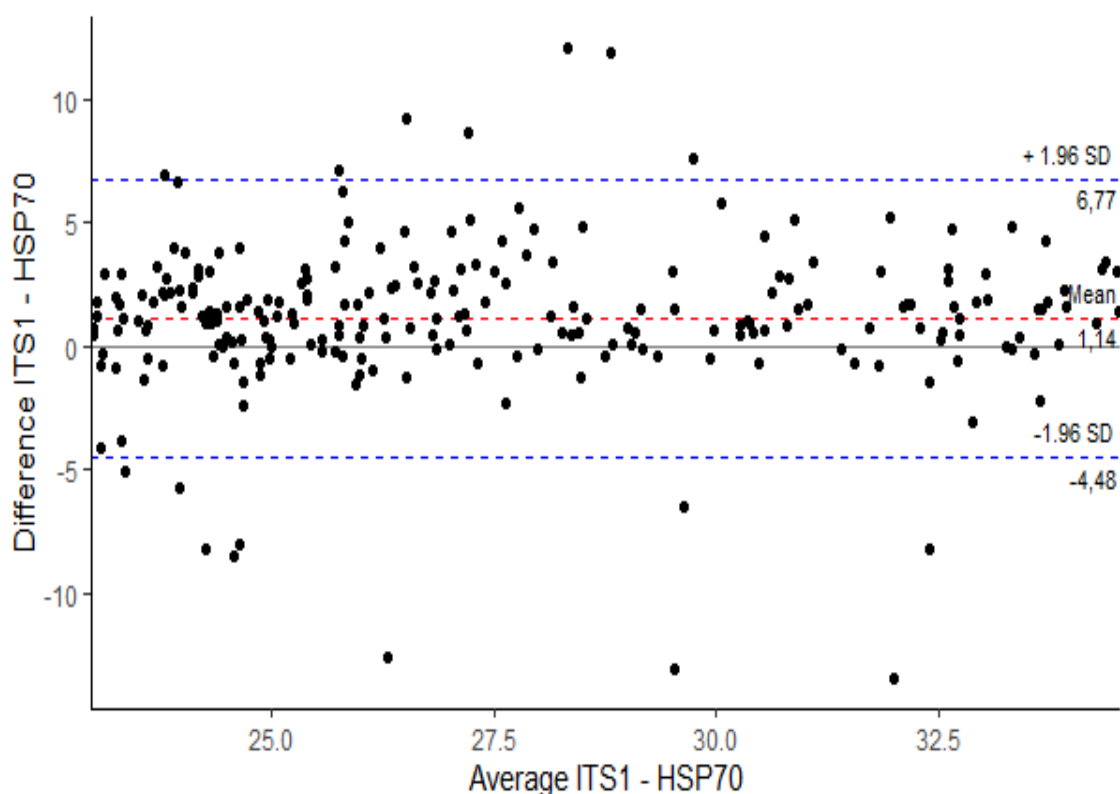


Figura 7: Gráfico de Bland-Altman para análise de concordância entre métodos moleculares utilizando qPCR ($n = 299$, representando amostras positivas tanto para *ITS1* quanto para *HSP70* com valores de quantificáveis). As diferenças entre as medições pareadas estão representadas no eixo y. A média dessas medições está representada no eixo x. Cada ponto representa uma medição pareada. Os limites de concordância são mostrados por linhas tracejadas azuis com intervalo de confiança de 95%. A linha tracejada vermelha representa a média das diferenças, e a linha preta representa o ponto zero.

5.6 Variação dos valores de dos sistemas moleculares em função do tipo de amostragem, das espécies e localização das lesões

Os resultados para o sistema VSS (n = 309; Média = 27.61 [IC: 18.70 – 39.42]), LSS (n = 09; Média = 22.34 [IC: 16.48 – 33.22]), SSG (n = 264; Média = 26.18 [IC: 18.57 – 38.70]) e SSB (n = 35; Média = 28.97 [IC: 21.15 – 37.90]) mostraram concentrações de DNA inferior ao controle interno ABCT (n = 442; Média = 21.97 [16.04 – 39.35]).

A comparação entre as medianas do *ABCT* nas amostras de biópsia e Imprint demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 7e^{-05}$), como esperado, pois, a concentração de DNA humano em biópsia ([Md] = 20.35) era superior ao Imprint ([Md] = 22.47) (**Figura S3E**). Os valores para o sistema SSV entre espécies do subgênero *Viannia* demonstraram diferença estatística entre (*L. (V.) guyanensis* Md = 26.09 vs *L. (V.) braziliensis* Md = 30.34; $p = 4e^{-05}$; $p_{\text{adj}} = 0.00027$), indicando que a concentração genética da *L. (V.) guyanensis* era maior nas amostras em comparação com *L. (V.) braziliensis* (**Figura S4A**). A associação permanece em amostras derivadas de biópsia (*L. (V.) guyanensis* Md = 25.75 vs *L. (V.) braziliensis* Md = 29.83; $p = 0.0012$; $p_{\text{adj}} = 0.036$) (**Figura S4B**). Em amostras de Imprint, a associação não se manteve após o ajuste, $p_{\text{adj}} = 0.15$ (**Figura S4C**).

Com base na localização das lesões, as medianas em amostras extraídas de biópsias e Imprint para lesões nos membros superiores (Md = 26.54), inferiores (Md = 26.63) e superiores/inferiores (Md = 26.37) foram maiores do que para lesões cervicais (Md = 21.41) (**Figura S5A**). Inicialmente foi notada uma diferença estatística ($p = 0.02$), sugerindo que a concentração do marcador VSS era maior nas lesões cervicais, porém com a correção para múltiplas comparações a significância não permaneceu ($p_{\text{adj}} = 0.5$). Em amostras de biópsia, o VSS também apresentou um padrão similar de resultados (lesões nos membros superiores Md = 25.87 vs cervical Md = 21.41; $p = 0.03$; $p_{\text{adj}} = 0.5$), e (membros superiores/inferiores Md = 25.83 vs cervical Md = 21.41; $p = 0.03$; $p_{\text{adj}} = 0.5$) (**Figura S6A**).

5.7 Análise comparativa dos marcadores moleculares: Correlação entre valores de com a progressão temporal e o número de lesões.

Por meio da regressão linear múltipla, avaliou-se qual das variáveis independentes tinha algum efeito sobre os resultados de C_t . Constatou-se que o tempo de lesão promoveu um efeito estatisticamente significativo sobre os valores de C_t dos marcadores *ITS1* ($\beta=0.36$; $p=3.04e^{-10}$), *HSP70* ($\beta=0.32$; $p=8.43e^{-08}$), **tabela S9**.

Foi observada uma correlação entre os valores dos sistemas de qPCR e o tempo de evolução das lesões. O VSS ($r=0.35$; $p=0.001$) e SSB ($r=0.39$; $p=0.032$) indicaram uma correlação positiva moderada (**Figura 8**). Essa correlação positiva sugere que, à medida que o tempo de evolução das lesões aumenta, a concentração genética do parasita tende a diminuir (ou seja, os valores de aumentam). O SSG mostrou uma correlação positiva fraca ($r=0.19$; $p=0.003$) (**Figura 8**).

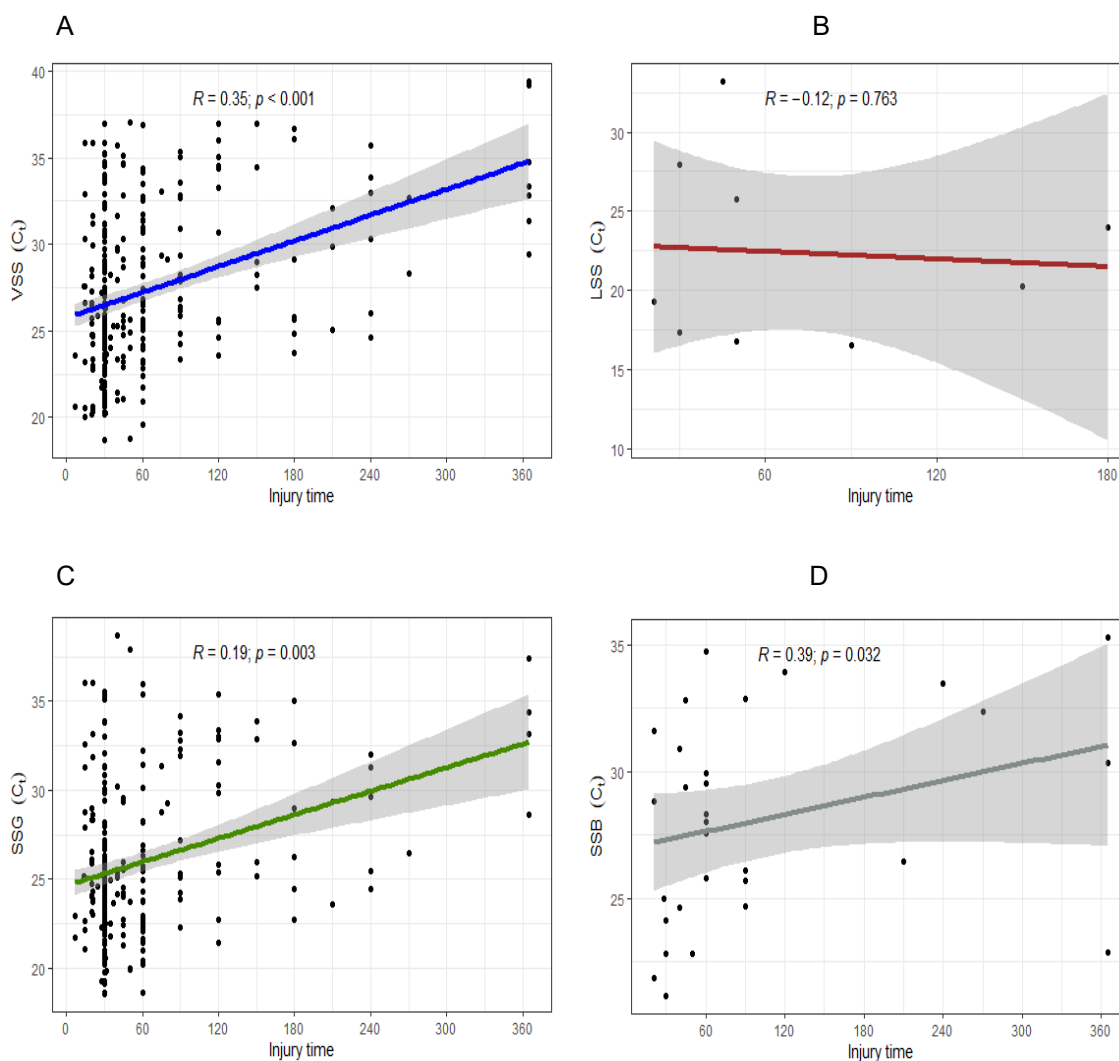


Figura 8: Regressão linear entre os valores de C_t e o tempo de evolução das lesões em amostras extraídas de biópsias e papel de filtro. A) Análise de regressão com VSS ($R = 0,35$; $p < 0,001$); B) Análise de regressão com LSS ($R = -0,12$; $p = 0,763$); C) Análise de regressão com SSG ($R = 0,19$; $p = 0,003$); D) Análise de regressão com SSB ($R = 0,39$; $p = 0,032$).

Em seguida, foi realizada a análise de correlação do modo estratificado por tipo de amostra. Em amostras de biópsia, o VSS ($r=0.40$; $p=0.001$) e o SSB ($r=0.45$; $p = 0.028$) indicaram uma correlação positiva moderada com o tempo de evolução das lesões (**Figura 9**). O SSG, por sua vez, obteve uma correlação positiva fraca ($r=0.23$; $p=0.001$). Essas correlações positivas sugerem que, em amostras de biópsia, quanto maior o tempo de evolução das lesões, menor é a concentração genética do parasita (**Figura 9**).

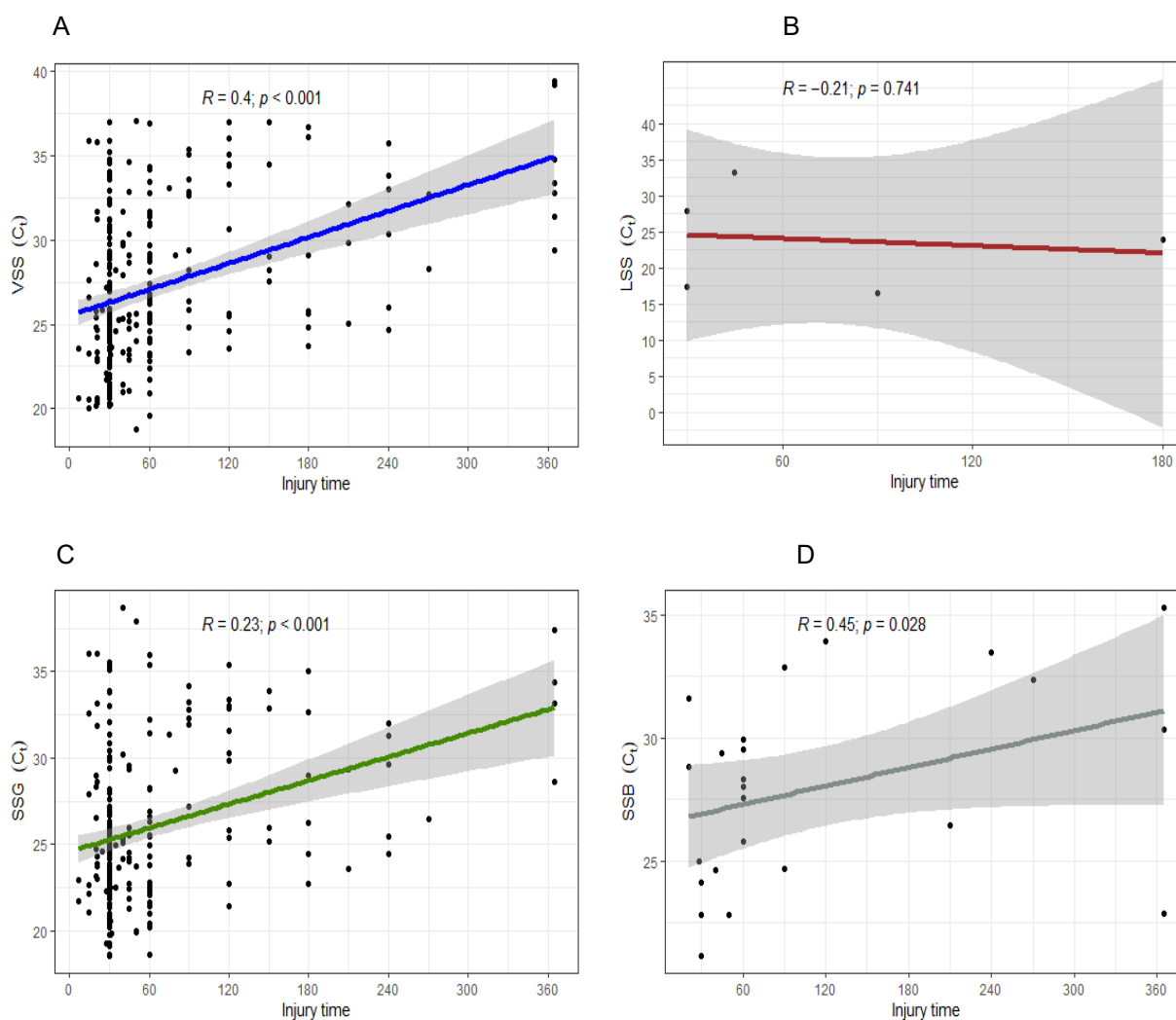


Figura 9: Regressão linear entre os valores de C_t e o tempo de evolução das lesões em amostras extraídas de biópsias. A) Análise de regressão com VSS ($R = 0,40$; $p < 0,001$); B) Análise de regressão com LSS ($R = -0,21$; $p = 0,741$); C) Análise de regressão com SSG ($R = 0,23$; $p < 0,001$); D) Análise de regressão com SSB ($R = 0,45$; $p = 0,028$). e) Análise de regressão com AB ($R = -0,075$; $p = 0,233$).

6. PRODUTO

Baseado nos resultados do presente trabalho, foram desenvolvidos dois produtos sendo o primeiro um protocolo técnico laboratorial utilizando os alvos gênicos *ITS1* e *HSP70* para identificação de espécies de *Leishmania* na LC na Amazônia (**APÊNDICE J**). O segundo produto é um artigo científico intitulado: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO MOLECULAR UTILIZANDO OS GENES *ITS1* E *HSP70* COMO ALVOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA EM LEISHMANIOSE CUTÂNEA AMERICANA NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL, que foi submetido a revista “SPECTRUM MICROBIOLOGY”. Em anexo segue os dados referentes a submissão (**APÊNDICE K**).

7. DISCUSSÃO

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar, por décadas, dependeu de ferramentas parasitológicas e sorológicas para caracterizar leishmanias em amostras procedentes de humanos e animais (109). A microscopia apresenta limitações importantes que podem comprometer sua acurácia diagnóstica. A sensibilidade do método é variável e frequentemente baixa, especialmente em lesões com baixa carga parasitária ou em formas clínicas crônicas, podendo resultar em falsos negativos (13). Além disso, o desempenho depende fortemente da experiência do examinador, o que pode introduzir viés de interpretação. Outro ponto crítico é a incapacidade da microscopia em diferenciar espécies de *Leishmania*, informação relevante para prognóstico e escolha terapêutica. (13)

Fatores como qualidade da amostra, preparo inadequado e degradação do material também influenciam diretamente os resultados, além das limitações diagnósticas, a microscopia também apresenta restrições operacionais importantes no contexto da Leishmaniose Tegumentar (31). A necessidade de coleta invasiva — como raspados de lesão, biópsias ou aspirados — pode gerar desconforto ao paciente e nem sempre garante material representativo, especialmente em lesões antigas ou parcialmente tratadas (26, 61).

A distribuição irregular dos parasitos nos tecidos também dificulta sua detecção, aumentando a chance de resultados falso-negativos (31, 60). Outro fator relevante é que a microscopia não permite monitoramento quantitativo preciso da carga parasitária, limitando seu uso no acompanhamento terapêutico quando comparada a métodos moleculares, como a qPCR (13,61).

Essas limitações reforçam que, embora a microscopia seja útil como método inicial, ela deve ser, sempre que possível, associada a técnicas mais sensíveis e específicas para melhorar a acurácia diagnóstica (13,35,61).

O advento dos métodos de biologia molecular revolucionou o diagnóstico ao possibilitar a detecção mais sensível, específica e rápida dos agentes

infecciosos. Neste estudo, foi relatado o desenvolvimento e a avaliação de sistemas de qPCR TaqMan™ (VSS, LSS, SSG, SSB) aplicados em amostras de biópsia e de papel de filtro. Essa técnica foi capaz de identificar dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) e duas espécies (L. (V.) *guyanensis* e L. (V.) *braziliensis*) por meio dos genes *ITS1* e *HSP70*, selecionados com base em sequências conservadas ou polimórficas e considerando métodos moleculares aplicados em espécies detectadas na América Latina (110). Espécies de baixa frequência, como L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi* e L. (L.) *amazonensis*, foram identificadas por sequenciamento.

A abordagem da qPCR no diagnóstico da LTA tem contribuído para o desenvolvimento de novas diretrizes sensíveis e específicas, fundamentais no processo diagnóstico, permitindo a implementação de um tratamento rápido e adequado. Contudo, a microscopia e a cultura ainda são ferramentas de diagnóstico primário em muitas regiões endêmicas, apesar de suas limitações de sensibilidade (111). Isso impulsiona a busca por novos protocolos que utilizem a qPCR. A incorporação de controles internos, como o marcador ABCT no presente estudo, alinha-se a abordagens previamente validadas na literatura (112,113). Essa estratégia é fundamental para reduzir a ocorrência de resultados falso-negativos, especialmente em amostras não padronizadas, como aquelas obtidas por papel de filtro para o diagnóstico de leishmaniose cutânea. A inclusão de tais controles assegura a confiabilidade dos ensaios moleculares, permitindo uma análise precisa e a diferenciação de outras patologias concomitantes, como esporotricose e hanseníase.

Todos os sistemas deste estudo demonstraram alta linearidade ($R^2 \geq 0,9992$). Os ensaios LSS e SSB exibiram eficiências de 95,7% e 94,5%, respectivamente, garantindo uma amplificação eficiente. Por outro lado, os sistemas VSS e SSG, com eficiências de 86,0–86,6%, mantiveram alta confiabilidade devido à excelente linearidade. Esse desempenho geral é consistente com o de ensaios validados publicados para *Leishmania* de diversas origens, incluindo espécies como L. (V.) *braziliensis* e L. (L.) *amazonensis* (114,115). Nossos resultados também coincidem com os critérios de eficiência

estabelecidos para seis espécies colombianas (113) e com a validação de ensaios para espécies do Velho Mundo (114).

Em relação ao limite de detecção, os ensaios VSS, LSS e SSG apresentaram uma sensibilidade notável de 66 fg, equivalente a uma cópia do genoma de *Leishmania*. O ensaio SSB alcançou um LOD de 188 fg, correspondente a duas cópias. Essa capacidade de detectar quantidades tão baixas de DNA do parasita é comparável aos limites reportados em estudos com *Leishmania* de origem sul-americana (96,101). O estudo de Filgueira et al. (2020) menciona a capacidade de detectar cargas parasitárias de até 10^{-1} par. eq./ μ g de DNA humano e utilizou DNA de *L. (V.) braziliensis* a 100 fg/ μ L como controle positivo; no entanto, o valor exato de LOD em cópias ou fg para cada ensaio não é explicitamente descrito, sendo inferido como altamente sensível dada a validação clínica (114). Adicionalmente, nossos resultados demonstram sensibilidade comparável à detecção de 3–12 parasitas por reação em ensaios com *L. donovani* e *L. infantum* (114), reforçando a relevância global de nosso método.

Nossos ensaios de qPCR demonstraram alta especificidade, visto que a análise de exclusividade não resultou em qualquer amplificação inespecífica em nenhum dos sistemas desenvolvidos (**Tabela S5**). Esse achado se alinha ao estudo de Wu et al. (2022), que desenvolveu um qPCR alelo-específico para *Leishmania* do Velho Mundo e reportou ausência de reação cruzada com outros patógenos (114). Em contrapartida, ensaios para *Leishmania* do Novo Mundo identificaram que o alvo 18S rDNA apresentava reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, embora o *HSP70* fosse específico (117). De forma semelhante, León et al. (2017) observaram que seu ensaio baseado em kDNA para espécies colombianas não era exclusivo, amplificando *T. cruzi* (104). Nossos resultados, portanto, indicam maior especificidade em comparação a alguns alvos tradicionalmente empregados.

Ao utilizar o SSG, foi observada amplificação para as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi*. Embora o sequenciamento posterior tenha revelado 100% de cobertura para *L. (V.) guyanensis* como a espécie infectante, a co-

amplificação de *L. (V.) shawi* é um achado que ressalta a complexidade da identificação molecular precisa em nível de espécie dentro do subgênero *Viannia* na região amazônica. Este resultado é consistente com evidências da plasticidade genômica em *Leishmania* e da ocorrência de parasitas híbridos em áreas endêmicas do Novo Mundo. Estudos anteriores já caracterizaram a presença de híbridos naturais entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* na região Amazônica brasileira (115,116). A circulação dessas linhagens híbridas também é apoiada por estudos entomológicos que identificaram a infecção de flebotomíneos com essas espécies, evidenciando ciclos de transmissão relevantes (117).

A complexidade se estende a outras espécies do subgênero *Viannia* relacionadas ao SSB. Apesar de ter sido desenhado para *L. (V.) braziliensis*, algumas amostras que amplificaram com este sistema foram altamente similares a *L. (V.) lainsoni* ou *L. (V.) naiffi*. Pesquisas realizadas no estado do Acre demonstraram co-circulação expressiva e predominância de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) lainsoni*, além de relatarem um híbrido *L. (V.) lainsoni/L. (V.) naiffi* (118). A capacidade de espécies como *L. naiffi* produzirem prole viável com *L. lainsoni* e *L. braziliensis* fornece base molecular para a indistinguibilidade observada em ensaios que utilizam marcadores com pouca variabilidade interespecífica (119).

Um dos aspectos limitantes deste estudo foi o desbalanceamento entre os tipos de amostras analisadas, com predominância de biópsias em relação às amostras coletadas em papel de filtro. Esse desequilíbrio pode ter influenciado a comparação entre os métodos, uma vez que a maior quantidade de biópsias tende a aumentar a representatividade estatística e a robustez dos resultados obtidos para esse tipo de material (141).

Além disso, estudos demonstram que amostras de biópsia geralmente apresentam maior carga parasitária e melhor rendimento de DNA quando comparadas às coletas em papel de filtro, favorecendo maior sensibilidade diagnóstica em métodos moleculares, como a PCR. Por outro lado, o papel de filtro permanece como uma alternativa importante devido à facilidade de coleta, armazenamento e transporte, especialmente em áreas remotas e endêmicas,

embora sua performance possa variar conforme a quantidade e a qualidade do material biológico obtido (142, 143). Dessa forma, o menor número de amostras em papel de filtro neste estudo deve ser considerado na interpretação dos resultados comparativos, podendo limitar a equivalência estatística entre as metodologias avaliadas (143).

Outro possível viés deste estudo está relacionado ao conhecimento prévio do padrão-ouro pelos responsáveis pela realização da qPCR. A consciência dos resultados previamente obtidos por métodos considerados de referência pode influenciar, ainda que de forma não intencional, etapas como interpretação de curvas de amplificação, definição de limiares de positividade e repetição de amostras inconclusivas, favorecendo a ocorrência de viés de aferição (144).

Esse tipo de viés é descrito na literatura como uma limitação metodológica em estudos de diagnósticos, especialmente quando não há cegamento dos avaliadores durante a execução e análise dos testes moleculares. Dessa forma, a ausência de mascaramento pode impactar a imparcialidade dos resultados e superestimar a concordância entre os métodos avaliados, sendo importante considerar esse aspecto na interpretação dos achados do estudo (145, 146).

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma limitação do presente estudo reside no fato de que os executores/analistas da qPCR tinham conhecimento dos resultados do exame parasitológico direto (padrão-ouro) durante a realização do teste molecular. Embora a interpretação da qPCR seja primariamente objetiva (baseada na detecção de valores de Ct), o conhecimento prévio do resultado do padrão-ouro pode, em alguns contextos, introduzir um potencial viés de verificação. Contudo, ressalta-se que os avaliadores da microscopia estavam cegos quanto aos resultados da qPCR, minimizando um viés importante de confirmação.

Pesquisas futuras poderiam se beneficiar da implementação de cegamento completo para ambos os testes, a fim de mitigar quaisquer vieses potenciais remanescentes. O número significativamente desigual de amostras de biópsia e de imprint também pode ter afetado a precisão das análises comparativas.

Adicionalmente, a falta de concordância quantitativa entre os valores de Ct dos marcadores *ITS1* e *HSP70*, bem como o uso da microscopia (um método de baixa sensibilidade) como padrão-ouro, são fatores que podem influenciar a interpretação completa de nossos resultados. Futuros estudos poderiam se beneficiar da validação de métodos com amostras pareadas em maior número, a fim de reduzir tais vieses e limitações

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

As evidências deste estudo fornecem uma base sólida para a incorporação do diagnóstico molecular nas rotinas clínicas e em programas de saúde pública. Pesquisas futuras poderiam se concentrar em uma validação multicêntrica mais ampla, bem como na automação desses ensaios, visando ao desenvolvimento de plataformas capazes de fornecer resultados rápidos e precisos diretamente no local de atendimento. Essa evolução tecnológica tem o potencial de revolucionar o controle da leishmaniose, permitindo a implementação de estratégias de manejo mais ágeis e direcionadas.

10. CONCLUSÃO

Neste estudo, demonstramos, com sucesso, o desenvolvimento e a validação de um painel de ensaios de qPCR que oferece um método robusto e preciso para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar. Os sistemas foram capazes de identificar, com alta sensibilidade e especificidade, os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, bem como as espécies de maior relevância epidemiológica na Amazônia brasileira, como *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*.

A validação bem-sucedida em amostras de papel de filtro ressalta a viabilidade e a praticidade dessa abordagem em ambientes com baixa infraestrutura, superando os desafios logísticos associados às biópsias. Além disso, a superioridade dos ensaios moleculares em relação à microscopia, especialmente na detecção de casos com baixa carga parasitária e no auxílio ao diagnóstico diferencial de outras dermatopatias, reforça sua utilidade clínica como ferramenta essencial para o aprimoramento das diretrizes de diagnóstico e tratamento da doença.

Portanto, as contribuições deste trabalho apresentam implicações significativas para um manejo mais eficaz dos pacientes e para o avanço das estratégias de vigilância e controle da leishmaniose.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102:1075-80.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. PMID: 28159546.
3. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res.* 2017; 6:750. doi:10.12688/f1000research.11120.1. PMID: 32245983.
4. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018;392(10151):951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2. PMID: 33747716.
5. Moura IM. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão sistemática. Salvador; 2013. viii; 35 p.
6. Velozo D, Ribeiro MC, Costa IMC, Cabral A, Motta JOC, Sampaio RNR. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An Bras Dermatol.* 2006;81(3):261-3. doi: 10.1590/S0365-05962006000300008.
7. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-77.
8. Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infe Dis.* 2007; 195:1846-51
9. World Health Organization. Global Leishmaniasis Report 2022. Geneva: WHO; 2024.
10. World Health Organization. Map gallery – Leishmaniasis (internet). Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/map-gallery-searchresults?&maptopics=910b5dfc-ce2e-4440-8b43-8d83f4a85485&term=leishmaniasis>. Acessado em 13 de dezembro de 2024.
11. Talhari S, Sardinha JC, Schettini APM, Arias JR, Naiff RD. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Resultados preliminares com a pentamidina. *An Bras Dermatol.* 2005; 60:361-4.

12. World Health Organization [Internet]. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2008.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2.^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. Série A. Normas e Manuais Técnicos.
14. World Health Organization. Global Leishmaniasis Report 2024. Geneva: WHO; 2024
15. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 2018;392(10151):951-70.
16. Oliveira MDS, Araújo FS. Vulnerabilidade das populações ribeirinhas à leishmaniose cutânea no Amazonas. *Rev Saúde Pública*. 2022;56.
17. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*. 2018;25(24):10-5.
18. Ministério da Saúde, Brasil. Boletim Epidemiológico de Leishmaniose Visceral, 2022.
19. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Leishmanioses: Epidemiologia das Américas, 2021.
20. Almeida MC, Santos MC, Barata RA. Análise da influência do desmatamento na leishmaniose no Brasil. *Rev Saúde Meio Ambiente*. 2020;15(2):121-30.
21. Silva Júnior FJ, Carvalho EP. Desafios para o controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52(6):789-93.
22. Killick-Kendrick R. The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903-1942. *Bull Soc Pathol Exot*. 2013; 106:131-7.
23. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):845-58.
24. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1–120.
25. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):239–251.
26. Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

27. Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MGV, Paes MG. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):1–
28. Brasil. Ministério da Saúde. *Guia de vigilância em saúde*. Brasília: Ministério da Saúde; 2022.
29. Farias ES, et al. Molecular identification of *Leishmania* species in the Amazonas state. *Acta Trop*. 2019;192:1–7.
30. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):279–289.
31. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147–154.
32. Guerra JA, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Clinical and diagnostic aspects of American tegumentary leishmaniasis in soldiers simultaneously exposed to the infection in the Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36:587-90.
33. Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*. 2006; 113:934-40.
34. Lima NT. O Brasil e a Organização Pan-americana da Saúde: uma história em três dimensões. In: Finkelman J, editor. *Caminhos da saúde no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 24-116.
35. Bastos TSA. Espécies de flebotomíneos e ecoepidemiologia na cidade de Goiás-GO, Brasil [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014. 57 p. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4106>.
36. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2017; 65:127-47.
37. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and proteion hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev*. 2019;201(1):206-24.
38. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 2021; 59:373-94.
39. Dantas-Torres F, de Brito MEF, Brandão-Filho SP. Leishmaniasis in Brazil: epidemiological and ecological aspects. *Parasites Vectors*. 2020;3(1):70-9.

40. Brasil. Guia de orientação: vigilância de leishmaniose tegumentar americana (LTA). 5ª ed. Santa Catarina; 2017. p. 1-45. Acesso em: 02 jul. 2024.
41. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2021;25(2):203-11.
42. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;99(3):239-51.
43. De Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. *Am J Clin Dermatol*. 2022; 23:823-40. doi: 10.1007/s40257-022-00726-8.
44. Varão FS, de Campos Júnior NIM, Furtado SSM, Miura P, de Seles RS, Silva LM. Leishmaniose tegumentar americana: relato de caso. *Ciênc Saúde*. 2023;27(123):1-5. doi: 10.5281/zenodo.8079858.
45. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infe Dis*. 2019;186(12):1829-34.
46. Hartley MA, Alexander R, Souza DM, et al. Leishmaniasis: current status of available treatments and future directions. *Front Microbiol*. 2019;11(1):65.
47. Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;82(6):1019-24.
48. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Escorcía B. Heterogeneity, geography, and evolution of leishmania in the Amazon Basin: insights from mass spectrometry. *Parasitol Today*. 2019;17(3):73-8.
49. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, et al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;87(3):243-52.
50. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infe Dis*. 2017;22(1):1-13.
51. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 2018;392(10151):951-70.

52. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado PR. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;40(6):556-60.
53. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, Carvalho EM et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg.* 2019;86(3):364-85.
54. Gontijo B, de Carvalho M. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018;36(1):71-80.
55. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004. PMID: 17714672.
56. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349. PMID: 25687688.
57. World Health Organization. *Leishmaniasis*. Geneva: WHO; 2022.
58. Centers for Disease Control and Prevention. *Leishmaniasis: Diagnosis and Testing*. Atlanta: CDC; 2023.
59. Alvarenga DG, Escalda PMF, Costa ASV, Monreal MTFD. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):194-7.
60. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017; 10:82. doi:10.1186/s13071-017-2028-5.
61. Asilian A, Sadeghinia A, Faghihi G, Momeni A. *International Journal of Dermatology.* 2004; 43:281.
62. Caminha AEQ, Soto-Blanco B. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, CE. *Arch Vet Sci.* 2008; 13:218-22.
63. Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LN, et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:159-62.

64. Cardoso CPL, Dadalti P, Gutierrez MCG, Ramos-E-Silva M. Leishmaniose: métodos diagnósticos. *Folha Med.* 2008;117(2):131-4.
65. Naiff MF, Cupolillo E, Naiff RD, Momen H, Barret TV, Grimaldi G Jr. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;32 Suppl 1:243.
66. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2294–7. doi:10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004.
67. Yssouf A, Almeras L, Terras J, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003473. doi: 10.1371/journal.pntd.0003473.
68. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *J Clin Microbiol.* 2007 Jul;45(7):2110–5. doi:10.1128/JCM.02555-06.
69. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic Press; 1987. p. 1–120.
70. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018 Sep 15;392(10151):951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
71. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(2):237–252. doi:10.1517/14656566.2015.973850.
72. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol Clin.* 2015 Jul;33(3):579–593. doi:10.1016/j.det.2015.03.018.
73. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infe Ther.* 2010;8(4):419–433. doi:10.1586/eri.10.19.
74. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Aug;9(8):604–615. doi:10.1038/nrmicro2608.
75. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999 Oct 2;354(9185):1191–1199. doi:10.1016/S0140-6736(98)10178

76. Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:951-8.
77. Okwor I, Uzonna J. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Jan;94(3):489–493. doi:10.4269/ajtmh.15-0408.
78. Dantas-Torres F. Leishmune® vaccine: a historical perspective of its rise and fall. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2016;58:e81. doi:10.1590/S1678-9946201658081
79. Tavares-Neto J, Barral A, Queiroz-Andrade M, Oliveira S. Caracterização sociodemográfica da população do povoado de Cavunge-Bahia Sociodemographic characterization of the Cavungeis village (Bahia, Brazil) population. *Rev Baiana Saúde Pública.* 2003;27(1):60-75.
80. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Molecular evolution and phylogeny of *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2008;30(5):649-57.
81. Uliana SRB, Floeter-Winter LM. Genomic and molecular markers for species typing in *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 2017;13(5):232-9.
82. Eresh S, Zaki E, Osman OF, El Fadil M, et al. Molecular identification of *Leishmania* by PCR-RFLP of the *ITS1* gene in clinical samples from Sudan. *Parasitol Int.* 2021; 82:102112.
83. Vides NA, Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 39:337-40.
84. Weller GM. Immunochromatographic techniques – a critical review. *Fresenius J Anal Chem.* 2003; 366:635-45.
85. Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, et al. Solution conformation of wild-type *E. coli Hsp70* (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8471-6.
86. McMullan G. PubMed abstracts, publisher full text and free full text. *J Med Libr Assoc.* 2015;69.
87. Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, et al. The use of *ITS1* sequences for detection and identification of *Leishmania* species in clinical samples. *Mol Ecol.* 2017;13(12):3135-43.
88. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, et al. American tegumentary leishmaniasis: DNA-based typing of *Leishmania* species in clinical samples from Bolivia. *J Clin Microbiol.* 2021;42(1):487-91.

89. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):664-74. doi:10.1590/s0074-02762012000500014. PMID: 22850958.
90. Laurent T, Rijal S, Yardley V, et al. Epidemiological dynamics of *Leishmania donovani* in Nepal: the role of molecular markers and sequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;5(4).
91. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, et al. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the mini-exon region and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2019;41(6):3147-53.
92. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;28(1):265-94.7.
93. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005 Nov;35(11-12):1169–1180. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.001.
94. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Sep;7(9):581–596. doi:10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
94. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 4;18(6):1296. doi:10.3390/ijms18061296.
95. Cohen JF, Korevaar da, Altman DG, Bruns de, Gatsonis CA, Hooft I, et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open*. 2016;6(11):e012799. doi:10.1136/bmjopen-2016-012799. PMID: 28137831; PMCID: PMC5128957
96. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. doi:10.1186/1471-2105-13-134. PMID: 22708584; PMCID: PMC3412702.
97. Kazemi B. Genomic organization of *Leishmania* species. *Iran J Parasitol*. 2011;6(3):1–18. doi: 10.22034/ijp.2011.22347292. PMID: 22347292.

98. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007;39(7):839–847. doi: 10.1038/ng2053. PMID: 17572675.
99. Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:117-143. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001001. PMID: 8561456.
100. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389. PMID: 12829325.
101. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134. PMID: 23402826.
102. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):873–882. doi: 10.1038/nrmicro1748. PMID: 22850958.
103. de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. *Am J Clin Dermatol.* 2022;23(6):823–840. doi: 10.1007/s40257-022-00726-8. PMID: 36103050.
104. León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, Cubides JR, Ramírez JD. Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front Microbiol.* 2017; 8:1907. doi: 10.3389/fmicb.2017.01907. PMID: 29046670.
105. Rasti S, Ghorbanzadeh B, Kheirandish F, Mousavi SG, Pirozmand A, Hooshyar H, Abani B. Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(5):610–615. doi: 10.1002/jcla.21910. PMID: 26891976.
106. Sagi O, Berkowitz A, Codish S, Novack V, Rashti A, Akad F, et al. Sensitive molecular diagnostics for cutaneous leishmaniasis. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(2):ofx037. doi: 10.1093/ofid/ofx037. PMID: 28795077.

107. Fekri Soofi Abadi M, Dabiri S, Fotouhi Ardakani R, Fani Malaki L, Amirpoor Rostami S, Ziasistani M, et al. Design and validation of real-time PCR: quantitative diagnosis of common *Leishmania* species in Iran. *Arch Iran Med*. 2016;19(7):496-501. doi: 10.15171/aim.2016.07. PMID: 27362244.
108. Filgueira CPB, Moreira OC, Cantanhêde LM, Farias HMT, Porrozzi R, Britto C, Boité MC, Cupolillo E. Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and *HSP70* genes in patients with American tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(10):e0008750. doi: 10.1371/journal.pntd.0008750. PMID: 33044986.
109. Morais RCS, Melo MGN, Goes TC, Silva REP, Morais RF, Guerra JAO, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Cavalcanti MP. Duplex qPCR for *Leishmania* species identification using lesion imprint on filter paper. *Exp Parasitol*. 2020; 219:108019. doi: 10.1016/j.exppara.2020.108019. PMID: 33053400.
110. Lima ACS, Gomes CMC, Capela MBC, et al. Molecular tools confirm natural *Leishmania (Viannia) guyanensis/L. (V.) shawi* hybrids causing cutaneous leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Parasites & Veors*. 2021;14:212. doi: 10.1186/s13071-021-04672-0. PMID: 33949621.
111. Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolete VC, Salcedo JM, et al. Natural *Leishmania (Viannia)* spp. infections in phlebotomine sand flies from the Brazilian Amazon region reveal new putative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis. *Parasites Veors*. 2016;9:198. doi: 10.1186/s13071-016-1500-4. PMID: 27235194.
112. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and charaerization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infe Dis*. 2003;47(1):349-358. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00093-2. PMID: 16619185.
113. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5249-5255. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004. PMID: 15528705.
114. Benício E, Gadelha EPN, Talhari C, Silva RM Jr, Ferreira LCL, Guerra JAO, et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 2011

Nov–Dec;86(6):1141-1144. doi:10.1590/S0365-05962011000600016. PMID: 22281902.

115. Benício E, Cordeiro M, Monteiro H, Moura, MAS, Oliveira C, Gadelha EPN, et al. Sustained presence of cutaneous leishmaniasis in urban Manaus, the largest human settlement in the Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Dec;93(6):1208-1213. doi:10.4269/ajtmh.14-0164. PMID: 26483119.

116. Delprete JA, de Almeida LV, Barros AM, Soler RC, Bittencourt AA, Luna EJA, Lindoso JAL, Braz LMA. Detection of internal transcribed spacer 1 and *hsp70* genetic markers using restriction fragment length polymorphisms and sequencing in identification of *Leishmania* species causing tegumentary leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2024 Jan;110(1):52-58. doi:10.4269/ajtmh.23-0063. PMID: 38081057.

117. Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira-Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Jul;107(5):664-674. doi:10.1590/S0074-02762012000500014. PMID: 22850958.

118. Espada CR, Ortiz PA, Shaw JJ, Barral AMP, Costa JML, Uliana SRB, Coelho AC. Identification of *Leishmania (Viannia)* species and clinical isolates of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 genes reveals some unexpected observations. *Diagn Microbiol Infe Dis.* 2018 Jul;91(4):312-318. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.004. PMID: 29653798.

119. Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, Roy S, Manna M. RFLPs of ITS, *ITS1* and *hsp70* amplicons and sequencing of *ITS1* of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *Leishmania tropica* with the disease. *Aa Trop.* 2012 Dec;124(3):229-234. doi: 10.1016/j.aatropica.2012.08.017. PMID: 22960646.

120. Gritti T, Carra E, Van der Auwera G, Solana JC, Gaspari V, Trincone S, Ortalli M, Rabitti A, Reggiani A, Rugna G, Varani S, Skin Leish Net Network. Molecular typing of *Leishmania* spp. causing tegumentary leishmaniasis in northeastern Italy, 2014–2020. *Pathogens.* 2024 Jan;13(1):19. doi:10.3390/pathogens13010019. PMID: 38251327; PMCID: PMC10820635.

121. Kato H, Gomez EA, Seki C, Furumoto H, Martini-Robles L, Muzzio J, Calvopiña M, Velez L, Kubo M, Tabbabi A, Yamamoto DS, Hashiguchi Y. PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. PLoS Negl Trop Dis. 2019 May 6;13(5): e0007403. doi: 10.1371/journal.pntd.0007403. PMID: 31059516; PMCID: PMC6522058.
122. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, Veland N, Jara M, Adui V, Castrillón C, Arévalo J, Moreno J, Cañavate C. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. Exp Parasitol. 2013 Jul;134(3):281-289. doi: 10.1016/j.exppara.2013.03.026. PMID: 23562705.
123. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. Parasit Veors. 2014 Nov 14; 7:501. doi:10.1186/s13071-014-0501-y. PMID: 25394418; PMCID: PMC4239372.
124. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SÖ, Jaffe CL, Baneth G. Detection and identification of Old World *Leishmania* by high-resolution melt analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Jan 26;4(1): e581. doi: 10.1371/journal.pntd.0000581. PMID: 20126255; PMCID: PMC2817070.
125. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2015 Apr;28(2):265-294. doi:10.1128/CMR.00104-14. PMID: 25114007; PMCID: PMC4402952.
126. Adams ER, Schoone GJ, Versteeg I, Gomez MA, Diro E, Mori Y, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2013 Aug;51(8):2554-2561. doi:10.1128/JCM.00381-13. PMID: 23675543; PMCID: PMC3716063.
127. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):540-546. doi:10.1128/JCM.41.1.540-546.2003. PMID: 12517891.

128. Apaza-Castillo YG, Aguilar-Ancori EG, Quispe-Flórez MM, Ramírez-Soto MC, Pacheco-Venero RL. PCR performance for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* complex using biopsy samples, compared with exudate samples from skin lesions on filter paper. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2020 Oct;114(10):721-724. doi:10.1093/trstmh/traa052. PMID: 3271054.
129. Espada CR, Ortiz PA, Shaw JJ, Barral AMP, Costa JML, Uliana SRB, Coelho AC. Identification of *Leishmania (Viannia)* species and clinical isolates of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 genes reveals some unexpected observations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Jul;79(3):312-318. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006. PMID: 23976920.
130. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, Silva NR, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One.* 2013 Jul 5;8(7): e62473. doi: 10.1371/journal.pone.0062473. PMID: 23976920; PMCID: PMC3743517.
131. Thomaz C, Mello CX, Espíndola OM, Shubach AO, Quintella LP, Oliveira RVC, Duarte ACG, Pimentel MIF, Lyra MR, Marzochi MCA. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One.* 2021 Jan 21;16(1): e0243978. doi: 10.1371/journal.pone.0243978. PMID: 33476320; PMCID: PMC7819606.
132. de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DH, et al. Detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* in American cutaneous leishmaniasis patients using real-time PCR. *Aa Trop.* 2012 Sep;124(3):179-185. doi: 10.1016/j.aatropica.2012.07.004. PMID: 22662146.
133. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology.* 2011 Apr;138(4):405-425. doi:10.1017/S0031182010001538. PMID: 17517415.

134. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990 Apr;71(3):267-275. doi:10.1016/0014-4894(90)90031-7. PMID: 17604451.
135. Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1826-1833. doi:10.1128/JCM.00208-13. PMID: 23554201; PMCID: PMC3716068
136. Pereira LO, Moreira RB, de Oliveira MP, Reis SO, Rabello A. Evaluation of parasite load by real-time PCR in American tegumentary leishmaniasis: a systematic review. *PLoS One*. 2020;15(7):e0236376. doi:10.1371/journal.pone.0236376.
137. PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1826-1833. doi:10.1128/JCM.00208-13. PMID: 23554201; PMCID: PMC3716068
138. Guimarães LH, Zacarias E, Nolasco ST, Filho AN, Lago J, Machado PRL, et al. The *Leishmania* skin test predicts clinic-immunologic and therapeutic outcomes in cutaneous leishmaniasis. *Pathogens*. 2024 Nov 19;13(11):1018. doi:10.3390/pathogens13111018.
139. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):358–365. doi:10.1128/JCM.40.2.358-365.2002.
140. Polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3147-3153. doi:10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003. PMID: 11825977.
141. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990 Apr;71(3):267-275. doi:10.1016/0014-4894(90)90031-7. PMID: 17604451.
142. Boggild AK, Valencia BM, Veland N, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, et al. Diagnostic accuracy of microscopy and molecular methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from filter paper lesion impressions in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):223-230. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0457.
143. Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(1):70-74. doi:10.1067/mjd.2003.505.

144. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015;351:h5527. doi:10.1136/bmj.h5527.
145. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155(8):529-536. doi:10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009.
146. Leeflang MMG, Deeks JJ, Gatsonis C, Bossuyt PMM. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Ann Intern Med*. 2008;149(12):889-897. doi:10.7326/0003-4819-149-12-200812160-00008.

12. APÊNDICE A - ORÇAMENTO



Esse estudo teve financiamento aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, através da chamada do edital n. 010/2021 - &I Áreas Prioritárias com o valor global de R\$ 39.875,00 (**APÊNDICE- A**).

Especificação	Qtd	Custo Unitário	Custo Total
Tubos EDTA	2	R\$ 220,00	R\$ 440,00
Curativo	2	R\$ 40,00	R\$ 80,00
Papel de filtro	2	R\$ 250,00	R\$ 500,00
<i>Punch</i> 4 mm	220	R\$ 27,00	R\$ 5.940,00
Cloridrato de lidocaína	5	R\$ 17,00	R\$ 85,00
Seringa descartável 03 ml, com agulha	220	R\$ 2,00	R\$ 440,00
Seringa descartável 05 ml, com agulha	220	R\$ 2,00	R\$ 440,00
Síntese de <i>Primers</i> na escala de 50 nmol, dessalinizado	12	R\$ 100,00	R\$ 1.200,00
Síntese de sondas com calda MGB	5	R\$ 2.500,00	R\$ 12.500,00
<i>Master Mix</i> para reação de q-PCR	2	R\$ 2.900,00	R\$ 5.800,00
<i>Hot Start</i> PCR Master Mix (1000 U)	1	R\$ 1.500,00	R\$ 1.500,00
MicroAmp Fast Optical 96-Well PCR and qPCR Plates	2	R\$ 450,00	R\$ 900,00
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	1	R\$ 450,00	R\$ 450,00
Filme adesivo óptico MicroAmp™	1	R\$ 1.900,00	R\$ 1.900,00
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing	1	R\$ 6.000,00	R\$ 6.000,00
Kit de extração			
Tampão de sequenciamento v3.1 5X	1	R\$ 400,00	R\$ 400,00
POP-7 Polímero para 3500/3500xL Genetic Analyzers	1	R\$ 1.300,00	R\$ 1.300,00
Auxílio pesquisa			R\$ 39.875,00
Bolsa de Apoio Técnico - AT (III)			R\$ 22.212,00

13. APÊNDICE B - EQUIPE DO PROJETO

Nome	Instituição	Função
Diogo Matos dos Santos	FUHAM	Aluno de pós graduação
Felipe Jules de A. Santos	FUHAM	Coordenador
Camila Gurgel dos Santos da Silva	FUHAM	Apoio Técnico
Cynthia de Oliveira Ferreira	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Cintia Mara Costa de Oliveira	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
André Luiz Leturiondo	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Ariani Batista Noronha	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Silmara Navarro Pennini	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Carolina Chrusciak Talhari Cortez	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Moacir Couto de Andrade Júnior	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Guilherme Caldas de Souza	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)
Michelle Fernanda de Andrade Souza	FUHAM	Pesquisador(a) / Executor(a)

15. APÊNDICE D - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO CEP FUHAM

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA	
- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Criação de ensaios moleculares para a identificação de espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas.	
Pesquisador Responsável: FELIPE JULES DE ARAUJO SANTOS	
Área Temática:	
Versão: 3	
CAAE: 54683621.8.0000.0002	
Submetido em: 29/04/2022	
Instituição Proponente: Fundação Alfredo da Malta	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM	
	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1874285	

16. APÊNDICE E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE (CONTINUA)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: " CRIAÇÃO DE ENSAIOS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO AMAZONAS."

Eu, Dr. Felipe Jules de Araújo Santos, biólogo e pesquisador na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta estamos convidando você que apresenta lesões referentes à leishmaniose na pele a participar voluntariamente deste estudo. Sua participação irá colaborar com o desenvolvimento e validação de novos alvos moleculares como método mais sensível e específico para o diagnóstico da leishmaniose. O objetivo desta pesquisa é desenvolver novos métodos moleculares com maior rapidez, sensibilidade e especificidade. O que pode ser fundamental para o seu diagnóstico e tratamento. Após aceitar participar voluntariamente do estudo você assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficará com uma via. Caso você confirme sua participação na pesquisa, será necessário responder um questionário com informações básicas sobre a sua pessoa e sobre a doença, tais como, local de moradia, diagnóstico e tratamento. Salientando que você terá toda liberdade para decidir entrar ou não na pesquisa. É também terá toda liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo de qualquer natureza. É possível que durante a pesquisa precisemos de algumas informações sobre dados de exames laboratoriais que você já fez. Portanto, pedimos o seu consentimento por escrito para pesquisar esses dados e os resultados de exames em seu prontuário eletrônico. A pesquisa será feita exclusivamente pelo pesquisador identificado neste documento ou por um técnico/bolsista membro da equipe do projeto autorizado pelo Coordenador geral da pesquisa Dr. Felipe Jules de Araújo Santos.

Você passará por um procedimento de raspagem parcial da lesão, posteriormente será levemente pressionado no local raspado um papel filtro para coleta do material biológico. Também será coletado um pequeno fragmento com cerca de 4 milímetro retirado da lesão suspeita usando anestésico local. Toda coleta será realizada mediante uma pequena cirurgia ou biópsia de pele, sendo coletadas as amostras da borda da lesão. O procedimento da biópsia será feito

no centro cirúrgico da FUHAM por um profissional médico qualificado e o raspado será realizado por um técnico qualificado da equipe de pesquisa. Também será coletado entre 2 a 5 ml de sangue total realizado pelo técnico qualificado da equipe de pesquisa.

RISCOS: Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor de pequena intensidade, leve sangramento após a retirada do fragmento, aparecimento de uma mancha roxa no local da retirada do fragmento, que desaparecerá em poucos minutos ou horas. Cuidados locais devem ser tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado por cerca de 4 minutos, manutenção do curativo após a coleta se estendendo por no mínimo 4 horas após cada coleta para que não ocorram sangramentos superficiais e para prevenir possíveis inflamações locais.

BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo trará benefícios potenciais diretos a você e outros portadores de leishmaniose, pois possibilitará a identificação do DNA do parasito (*Leishmania*) de pessoas infectadas. De posse dessas informações você e seu médico podem tomar decisões mais acertadas sobre a condição da doença ou o seu tratamento.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS: O pesquisador responsável por este estudo estará disponível para esclarecer dúvidas que você possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. O pesquisador pode ser encontrado no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta. A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, pelo grupo de pesquisa ou pela FUHAM. As informações relacionadas a este estudo poderão ser conhecidas somente pela equipe coordenadora do estudo e membros do Comitê de Ética da FUHAM. Cada participante receberá um número de forma que o seu nome será mantido em segredo, mesmo que suas informações sejam usadas no estudo ou para publicação. Todo material coletado será devidamente identificado por números ou códigos de identificação e não pelos nomes dos pacientes, garantindo assim, a preservação da identidade do paciente. Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Mas você tem garantia de receber ressarcimento por gastos que ocorrerem durante a participação no estudo. Você será ressarcido quanto aos gastos ocorridos durante a coleta de dados, como

auxílio locomoção, alimentação e qualquer outro gasto proveniente da sua participação na pesquisa como descrito (item iv.3.g, da resolução cns nº. 446 de 2012). Além de ser indenizado caso haja algum dano ao mesmo, além de cobertura do material utilizado no reparo ao dano como descrito (resolução cns nº 466 de 2012, iv.3.h, iv.4.c e v.7).

Também poderá a qualquer momento entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa/FUHAM para esclarecimentos, sugestões e denúncias pelo Telefone 3632-5972, ou comparecer a Rua Codajás, nº 24, Cachoeirinha, Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, 1º Andar, Sala 14, ou pelo e-mail CEP@fuam.am.gov.br (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d). A sua amostra será processada e armazenada no laboratório de biologia molecular. Após o termino da pesquisa e publicação dos resultados a sua amostra será devidamente descartada.

Você terá a garantia de que problemas como desconforto decorrente da coleta de sangue serão assistidos, tratados e acompanhados pela equipe do projeto e pela assistência medica da FUHAM sem quaisquer gastos para você durante todo o tempo que for necessário. Da mesma forma, você terá direito à indenização diante de danos permanentes ou não relacionados exclusivamente a participação neste estudo. Ressalta-se que lesões anteriores a este estudo e omitidas durante a aplicação dos questionários levarão a perda da indenização. Os seus materiais coletados (biopsia, papel filtro e sangue) serão utilizados exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo.

CONSENTIMENTO

Eu, _____
_____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados. Também autorizo o armazenamento das minhas amostras biológicas. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma

via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura ou Impressão Datiloscópica do Sujeito da Pesquisa

Manaus, _____ de _____ de _____

Declaramos que obtivemos de forma apropriada e voluntária o
Consentimento Livre e
Esclarecido deste indivíduo para a participação neste estudo.

Felipe Jules
Pesquisador Responsável

17. APÊNDICE F - TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS – TCUD (CONTINUA)

Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

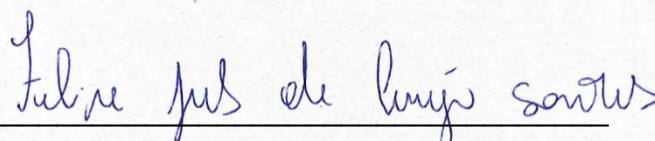
Eu, (Felipe Jules de Araújo Santos), comprometo-me com a coletar os dados contidos no (Excel e Dropbox), para obtenção dos objetivos previstos no Projeto de Pesquisa intitulado: “Criação de ensaios moleculares para a identificação de espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas.”, somente após receber a aprovação do sistema CEP/CONEP.

Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados nos (arquivos/prontuários/banco de dados, bem como com a privacidade de seus conteúdos.

Esclareço que os dados a serem coletados se referem a (Idade, sexo, endereço, doença, quantidade de lesões, tempo de adoecimento, tratamento, desfecho clínico, espécie da *Leishmania*), no período de 01/04/2022 a 31/12/2026.

Declaro entender que é minha à responsabilidade de cuidar da integridade das informações e de garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas. Também é minha a responsabilidade de não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, às pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa. Por fim, comprometo-me com a guarda, cuidado e utilização das informações apenas para cumprimento dos objetivos previstos na pesquisa acima referida.

Manaus, 28 de março de 2022.



Assinatura do Pesquisador Principal

18. APÊNDICE G - APROVAÇÃO DO RECURSO FINANCEIRO PELA FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO AMAZONAS. (FAPEAM)

Chamada	EDITAL N. 010/2021 - CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS		
Programa	CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS - Programa de Apoio a Ciência, Tecnologia e Inovação em áreas prioritárias para o Estado do Amazonas		
Termo de Outorga	099/2022	Número do Protocolo	54802.UNI855.18522.230820 21
Tipo	Final		
Nome do Outorgado	Felipe Jules de Araujo Santos	Período	14/03/2022 a 05/12/2023
Título do Projeto	Criação de ensaios moleculares para a identificação de espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas.		
Instituição	Fundação Hospitalar de Dermatologia Tropical e Venerologia Alfredo da Matta		
Área de Conhecimento	Medicina		
Valor Financiado	R\$ 39.875,00		

19. APÊNDICE H - TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Cepas, espécies, origem e números de acesso ao GenBank (*HSP70*) de isolados de *Leishmania spp.* utilizados para o desenho de primers e sondas.

CÓDIGO DO ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	GenBank
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 317P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368240.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 316P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368239.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 299P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368238.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 292G	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368237.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 292P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368236.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 258P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368235.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 253P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368234.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 247P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368232.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 246P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368231.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 243P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368230.1
MHOM/BR/2002/RBO01	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU071178.1
MHOM/BR/2007/029-ZAV	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368226.1
MHOM/BR/2007/025-LFA	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368225.1
MHOM/BR/2007/018-MAS	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368224.1
MHOM/BR/2007/014-JIS	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368223.1
MHOM/BR/2007/011	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368222.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 328P	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368220.1
MHOM/BR/1997/NMT-MAO 324G	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	GU368218.1
MHOM/BR/07/029-ZAV	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	FN395053.1
MHOM/BR/2002/ACVJ	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	MG029128.1
PA_180	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	KX573974.1
MHOM/BR/1975/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	KX573934.1
MHOM/EC/2016/BCN-885	<i>L. guyanensis</i>	Espanha	MT498900.1
MHOM/EC/2002/BCN-545	<i>L. guyanensis</i>	Espanha	MT498871.1
CFCO2016123	<i>L. guyanensis</i>	Colômbia	OM621852.1
MHOM/CO/83/REST417	<i>L. guyanensis</i>	Colômbia	HF586357.1
MHOM/GF/85/LEM699	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	FN395052.1
MHOM/GF/2004/GAE1	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	HF586406.1
HF586362.1	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	HF586362.1
MHOM/GF/2004/LBC43	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	HF586361.1
MHOM/EC/90/UI.031	<i>L. guyanensis</i>	Equador	HF586378.1
MHOM/EC/90/JUBERLY	<i>L. guyanensis</i>	Equador	HF586360.1
PAN565	<i>L. guyanensis</i>	Panamá	MW288824.1
MHOM/PE/02/LH2372	<i>L. guyanensis</i>	Peru	FN395051.1
MHOM/BR/2002/NMT-LTCP14563-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368210.1
MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14369-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368209.1

MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14509-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368207.1
MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14418-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368204.1
MHOM/BR/2001/JOLIVAL	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368203.1
MHOM/BR/2002/NMT- LTCP14566-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368202.1
MHOM/BR/2006/ICA	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368201.1
MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14627-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368200.1
MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14624-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368198.1
ER114	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MW531754.1
MHOM/BR/75/M2904	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	JF449366.1
MHOM/BR/1975/M2903	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	KX573933.1
MHOM/BR/2000/LTCP1339	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU071186.1
MHOM/BR/2002/LMG 70	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU071181.1
MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14418-P	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368205.1
MHOM/BR/2001/RGJ	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368183.1
MHOM/BR/2001/RGJ	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368181.1
MHOM/BR/2002/EMM	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368180.1
MHOM/BR/2002/EMM	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	GU368179.1
EM_099	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MF344845.1
EM_062	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MF344844.1
CFCO2016140	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	OM621847.1
CFCO2016138	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	OM621846.1
CFCO2016131	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	OM621845.1
CFCO2016136	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	OM621844.1
CFCO201648	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	OM621843.1
MHOM/CO/2018/ITM18071121	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	MZ362280.1
MHOM/CO/90/LEM2216	<i>L. braziliensis</i>	Colômbia	HF586371.1
MHOM/BO/2014/CUM-1264	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	OP561807.1
MHOM/BO/2014/CUM-1267	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	OP561805.1
MHOM/BO/2015/CUM-1376	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	MW507526.1
MHOM/BO/2015/CUM-1373	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	MW507524.1
MHOM/BO/2015/CUM-1370	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	MW507522.1
MHOM/BO/2015/CUM-1320	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	MW507507.1
MHOM/BO/90/AN	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	HF586370.1
PA_287	<i>L. braziliensis</i>	Panamá	KX573983.1
PA_029	<i>L. braziliensis</i>	Panamá	KX573945.1
MHOM/PE/--/LC1407cl5	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR872766.1
MHOM/PE/--/CU00181	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR872764.1
MHOM/PE/--/LH3851	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR872763.1
MHOM/PE/02/PER104/0	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR715989.1
MHOM/PE/01/PER002/0	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR715986.1
MHOM/PE/01/PER006/1	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FR715987.1
MHOM/PE/83/STI139	<i>L. braziliensis</i>	Peru	LN907833.1
MHOM/PE/--/LH1099	<i>L. braziliensis</i>	Peru	HF586375.1
MHOM/GF/2014/ITM14042451	<i>L. braziliensis</i>	Guiana Francesa	MZ362365.1

MHOM/GT/2018/ITM18070595	<i>L. braziliensis</i>	Guatemala	MZ362298.1
MHOM/GF/2017/ITM17012170	<i>L. braziliensis</i>	Guiana Francesa	MZ362297.1
MHOM/BR/1975/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	Este estudo
MHO/BR/1975/M2903	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	Este estudo
MDAS/BR/1979/M5533	<i>L. naiffi</i>	Brasil	Este estudo
MHOM/BR/1981/M6426	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	Este estudo
MCEB/BR/1984/M8408	<i>L. shawi</i>	Brasil	Este estudo
IFLA/BR/1967/PH8	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	Este estudo

Tabela suplementar 2. Cepas, espécies, origem e números de acesso ao GenBank (*ITS1*) e de isolados de *Leishmania spp.* utilizados para o desenho de primers e sondas.

Código do isolado	Espécies	Origem	GenBank
MHOM/GF/2004/LBC45	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	DQ182541 .1
MHOM/GF/2004/LBC43	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	DQ182540 .1
MHOM/GF/2003/LBC40	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	DQ182539 .1
MHOM/GF/2004/LBC41	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	DQ182538 .1
CxES01408	<i>L. guyanensis</i>	Guiana Francesa	MN604095 .1
MHOM/BR/75/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	FJ753387
MHOM/BR/75/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	FJ753390
MHOM/BR/75/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	FJ753389. 1
M1176	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	OK033933 .1
J176	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	MT606266 .1
MHOM/BR/2002/NMT-RBO013	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	FN398331. 1
MHOM/PE/2006/LH3635	<i>L. guyanensis</i>	Peru	FN398332. 1
MHOM/PE/2006/LH3668	<i>L. guyanensis</i>	Peru	FN398330. 1
CxES01406	<i>L. guyanensis</i>	Costa Rica	MN604094 .1
MHOM/BR/2006/EFSF	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	JQ061322. 1
MHOM/BR/84/LTB300	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	DQ182537 .1
MHOM/BR/75/M2903	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	FJ753374. 1
MHOM/BR/1994/H3227	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MW53863 4.1
MHOM/BR/2013/ER271	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MT940888 .1
MHOM/BR/2009/ER114	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MT940880 .1
MHOM/BR/2007/ER004	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MT940876 .1
MHOM/BR/2013/ER269	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MT940887 .1
AM30	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MF802823 .1
MT606270.1	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	MT606270 .1

5E2344B	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	KF985166. 2
MHOM/PE/2003/LH292 0	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FN398337. 1
MHOM/PE/2006/CU001 76	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FN398336. 1
MHOM/PE/2002/LH221 5	<i>L. braziliensis</i>	Peru	FN398333. 1
MHOM/PY/2000/KA9	<i>L. braziliensis</i>	Paraguai	FN398334. 1
IAYR/BR/1986/EO337	<i>L. naiffi</i>	Brasil	MW53863 8.1
MDAS/BR/1979/M5647	<i>L. naiffi</i>	Brasil	MW53863 7.1
MDAS/BR/1979/M5533	<i>L. naiffi</i>	Brasil	MW53863 6.1
J157	<i>L. naiffi</i>	Brasil	MT606263 .1
MDAS/BR/1979/M5533	<i>L. naiffi</i>	Brasil	FN398152. 1
MCEB/BR/1984/M8408	<i>L. shawi</i>	Brasil	MW53863 5.1
J202	<i>L. shawi</i>	Brasil	MT606262 .1
J30	<i>L. shawi</i>	Brasil	MT606255 .1
J6	<i>L. shawi</i>	Brasil	MT606242 .1
MCEB/BR/1984/M8408	<i>L. shawi</i>	Brasil	FN398328. 1
MHOM/BR/1981/M6426	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	MW53864 0.1
voucher RPMI	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	MG776303 .1
P45	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	MN759036 .1
MHOM/BR/1981/M6426	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	FN398154. 1
75468	<i>L. lainsoni</i>	Tailândia	KY982657. 1
723257	<i>L. lainsoni</i>	Tailândia	KY982656. 1
MHOM/BR/73/M2269	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	HG512964 .1
MHOM/CO/82/CELIS	<i>L. amazonensis</i>	Colômbia	HG512933 .1
MHOM/PA/87/GML416	<i>L. amazonensis</i>	Panamá	HG512932 .1
PH8	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	OK033930 .1

MHOM/BR/73/M2269	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	DQ182536 .1
IFLA/BR/67/PH8	<i>L. amazonensis</i>	México	AF339753. 1
MHOM/BR/1975/M4147	<i>L. guyanensis</i>	Brasil	Este estudo
MHO/BR/1975/M2903	<i>L. braziliensis</i>	Brasil	Este estudo
MDAS/BR/1979/M5533	<i>L. naiffi</i>	Brasil	Este estudo
MHOM/BR/1981/M6426	<i>L. lainsoni</i>	Brasil	Este estudo
MCEB/BR/1984/M8408	<i>L. shawi</i>	Brasil	Este estudo
IFLA/BR/1967/PH8	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	Este estudo

Tabela suplementar 3. Otimização das concentrações de primers e sondas para ensaios de qPCR para os alvos *ITS1* e *HSP70*. Descrição dos valores médios do desvio padrão nas diferentes combinações de concentrações entre primers (300 nM/500 nM) e sondas (100 nM/150 nM/200 nM).

Concentração do primer Forward/Reverse	Concentração da sonda	LSS (Média ± DP)	VSS (Média ± DP)	SSG (Média ± DP)	SSB (Média ± DP)
300/300 nM	100 nM	18.82 ± 0.20	18.98 ± 0.26	18.15 ± 0.28	18.05 ± 0.16
500/500 nM	100 nM	19.06 ± 0.79	19.75 ± 0.85	18.06 ± 0.94	17.96 ± 0.01
300/500 nM	100 nM	18.53 ± 0.04	18.37 ± 0.67	17.63 ± 0.02	17.97 ± 0.06
500/300 nM	100 nM	18.68 ± 0.14	18.23 ± 0.23	17.92 ± 0.18	18.29 ± 0.52
300/300 nM	150 nM	18.10 ± 0.06	18.43 ± 0.03	18.03 ± 0.10	17.72 ± 0.03
500/500 nM	150 nM	18.23 ± 0.07	19.23 ± 0.27	21.25 ± 0.71	17.87 ± 0.06
300/500 nM	150 nM	18.22 ± 0.06	17.96 ± 0.26	17.73 ± 0.22	17.77 ± 0.05
500/300 nM	150 nM	18.41 ± 0.16	18.12 ± 0.96	18.31 ± 0.32	17.87 ± 0.03
300/300 nM	200 nM	18.18 ± 0.25	18.88 ± 0.45	27.55 ± 0.90	17.83 ± 0.04
500/500 nM	200 nM	17.96 ± 0.02	17.23 ± 0.33	18.22 ± 0.11	17.70 ± 0.05
300/500 nM	200 nM	17.99 ± 0.12	17.55 ± 0.76	18.28 ± 0.08	17.65 ± 0.12
500/300 nM	200 nM	18.17 ± 0.14	18.34 ± 0.14	18.24 ± 0.15	17.58 ± 0.20

Nota: DP: Desvio padrão. nM: Nanomolar

Tabela suplementar 4. Cálculos da massa de DNA equivalente a um parasita.

Espécies	Tamanho do Genoma (bp)	Cálculo da massa do DNA nuclear (fg)	Massa do kDNA (15.8%) (fg)	Massa total de do parasita (fg)	Número de acesso ao GenBank
<i>L. (V.) guyanensis</i>	32.54×10 ⁹	$m = 32.54 \times 10^9 \text{ bp} \times 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp} \times 2 \text{ (n)} = 71.3 \text{ fg}$	11.27	82.6	GCA_024970365.1
<i>L. (V.) braziliensis</i>	32.13×10 ⁹	$m = 32.13 \times 10^9 \text{ bp} \times 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp} \times 2 \text{ (n)} = 70.4 \text{ fg}$	11.12	81.5	GCA_000002845.2
<i>L. (L.) amazonensis</i>	32.15×10 ⁹	$m = 32.15 \times 10^9 \text{ bp} \times 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp} \times 2 \text{ (n)} = 70.4 \text{ fg}$	11.13	81.5	GCA_005317125.1

Nota: kDNA: Cinetoplasto DNA. g: grama. bp: pares de base. fg: fentograma. A massa (m) de um parasita é calculada usando a seguinte fórmula: $m = [\text{Tamanho do genoma (bp)} \times 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp} \times \text{Ploidy}] + (15.8\% \text{ massa do kDNA})$

Tabela suplementar 5. Resultados do ensaio de inclusividade e exclusividade para espécies de *Leishmania* e outros microrganismos.

Espécies de <i>Leishr</i>	VSS (C_t)	LSS (C_t)	SSG (C_t)	SSB (C_t)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	C _t = 18.	ND	C _t = 16.3	ND
<i>L. (V.) braziliensis</i>	C _t = 18.	ND	ND	C _t = 16
<i>L. (V.) naiffi</i>	C _t = 18.	ND	ND	C _t = 17.5
<i>L. (V.) lainsoni</i>	C _t = 19.	ND	ND	C _t = 18.5
<i>L. (V.) shawi</i>	C _t = 20.	ND	C _t = 18.3	ND
<i>L. (L.) amazonensis</i>	ND	C _t = 15.5	ND	ND
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Trypanosoma rangeli</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Plasmodium vivax</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium leprae</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ND	ND	ND	ND

Nota: LSS: Sistema subgênero *Leishmania*. VSS: Sistema subgênero *Viannia*. SSG: Sistema espécie *L. (V.) guyanensis*. SSB: Sistema espécie *L. (V.) braziliensis*. C_t: Ciclo threshold. ND: Não detectado.

Tabela Suplementar 6. Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo (N=442).

Características	Valor (N=442)
Gênero	
Feminino	88 (20%)
Masculino	354 (80%)
Idade (Média ± SD)	
Feminino	44.10 ± 17.80
Masculino	38.47 ± 14.18
Tipo de amostra	
Biópsia	381 (86%)
Papel filtro	61 (14%)
Exame microscópico	
Positivo	311 (70%)
Negativo	131 (30%)
Exame microscópico por tipo de amostra	
Positivo – Biópsia	271 (61%)
Negativo – Biópsia	110 (25%)
Positivo – Papel Filtro	40 (9%)
Negativo – Papel Filtro	21 (5%)
Região geográfica	
BR – 174	101 (23%)
AM – 010	85 (19%)
Ramal Pau Rosa	13 (3%)
Manaus	12 (2.7%)
Rio Preto da Eva	12 (2.7%)
Presidente Figueiredo	04 (0.9%)
Outros municípios	30 (6.7%)
Não informada	185 (42%)
Profissão	
Atividade extrativista	76 (17%)
Outros	117 (27%)
Não informada	249 (56%)
Número de lesões no paciente (N=318)	
1	169 (53.1%)
2	69 (21.7%)
3	30 (9.4%)
4	12 (3.8%)
5	15 (4.7%)
6	02 (0.6%)
8	03 (0.9%)
9	01 (0.3%)
Não informada	17 (5.4%)
Local da Lesão (N=301)	
Cervical	03 (1%)
Tronco humano	09 (3%)
Membro inferior	104 (34%)
Membro superior	152 (51%)
Superior/Inferior	33 (11%)
Espécie de <i>Leishmania</i> (N=318)	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	264 (83%)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	38 (12%)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	09 (2.8%)
<i>L. (V.) lainsoni</i>	06 (1.9%)
<i>L. (V.) naiffi</i>	01 (0.3%)

Tabela Suplementar 7. Patologias Detectadas em Amostras Negativas para Leishmaniose por qPCR e Microscopia.

Patologias	Quantidade	Porcentagem (%)
Esporotricose	21	16.94
Hanseníase	13	10.48
Úlcera cutânea crônica	12	9.68
Câncer de pele	6	4.84
Abcesso cutâneo	4	3.23
Pioderma	4	3.23
Cromomicose	2	1.61
Dermatoses	2	1.61
Tuberculoses	2	1.61
Picada de inseto	2	1.61
Cisto epidérmico	1	0.81
Sífilis	1	0.81
Psoríase	1	0.81
Dermatite alérgica	1	0.81
Infecção microbacteriana	1	0.81
Hernia ventral	1	0.81
Fibrose cutânea	1	0.81
Foliculite	1	0.81
Granuloma anular	1	0.81
Dermatite atópica	1	0.81
Indeterminada	46	37.10
Total	124	100%

Tabela Suplementar 8. Sensibilidade e especificidade dos sistemas moleculares estratificados em biópsias e imprint comparados à microscopia.

Teste molecular	Biópsia		Imprint	
	Microscopia +	Microscopia -	Microscopia +	Microscopia +
qPCR <i>ITS1+</i>	271 (100%)	7 (6%)	qPCR <i>ITS1+</i>	271 (100%)
qPCR <i>ITS1 -</i>	0 (0%)	103 (94%)	qPCR <i>ITS1 -</i>	0 (0%)
Total	271	110	Total	271
qPCR <i>HSP70+</i>	266 (100%)	6 (5%)	qPCR <i>HSP70+</i>	266 (100%)
qPCR <i>HSP70 -</i>	0 (0%)	104 (95%)	qPCR <i>HSP70 -</i>	0 (0%)
Total	266	110	Total	266

Tabela Suplementar 9. Modelo de regressão linear múltipla entre os valores de C_i e variáveis independentes, incluindo tempo e número de lesões.

Alvo	Variável	β	R^2	R^2 adj	IC 95%	p
<i>ITS1</i>	Tempo l lesão	0.36	0.1316	0.1286	0.023 (0.016 – 0.030)	$3.04e^{-10}$
	Número de lesões	0.065	-	-	0.23 (-0.15 – 0.61)	0.237
<i>HSP70</i>	Tempo l lesão	0.32	0.1041	0.1007	0.020 (0.013 – 0.027)	$8.43e^{-08}$
	Número de lesões	0.06	-	-	0.19 (-0.17 – 0.56)	0.298

Nota: β : Coeficiente beta padronizado. R^2 : coeficiente de determinação, R^2 adj: coeficiente de determinação ajustado.

20. APÊNDICE I - FIGURAS SUPLEMENTARES

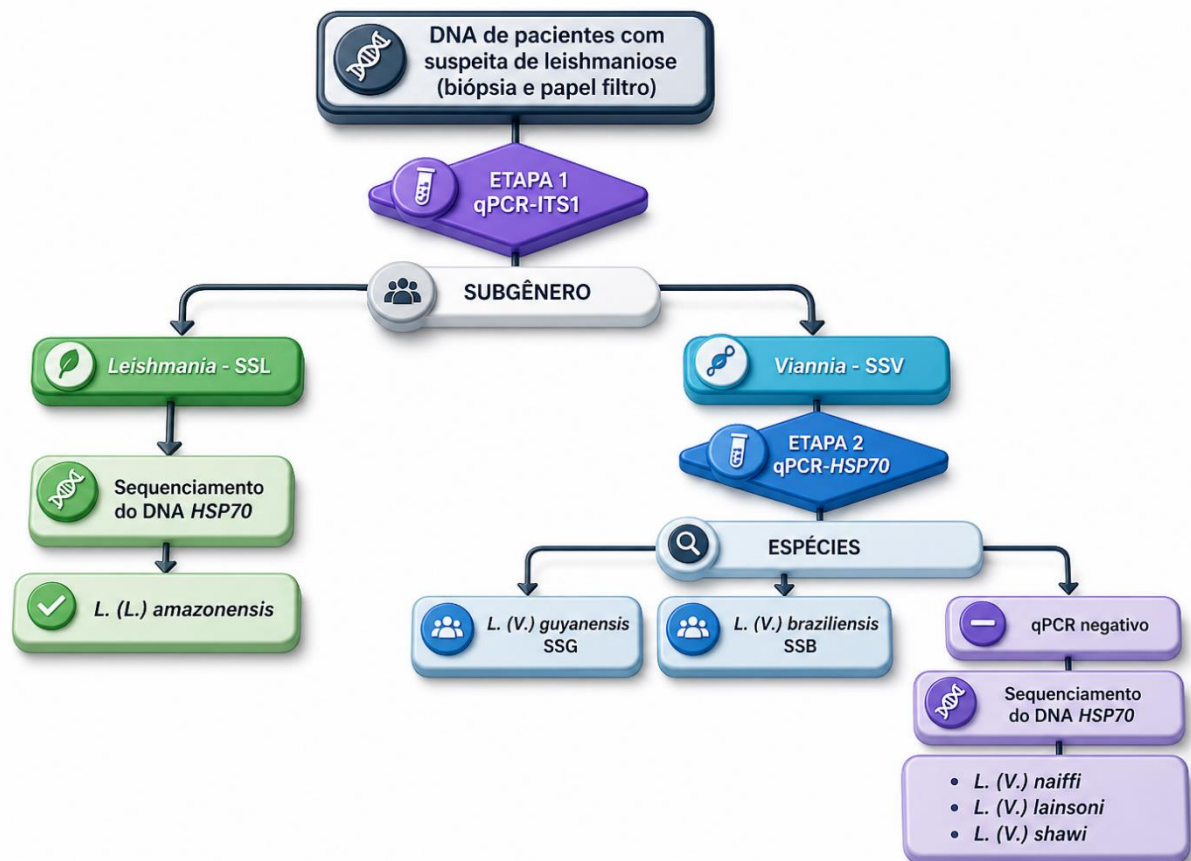


Figura Suplementar 1. Fluxo de trabalho do diagnóstico para qPCR e sequenciamento de DNA na detecção molecular de subgênero e espécie

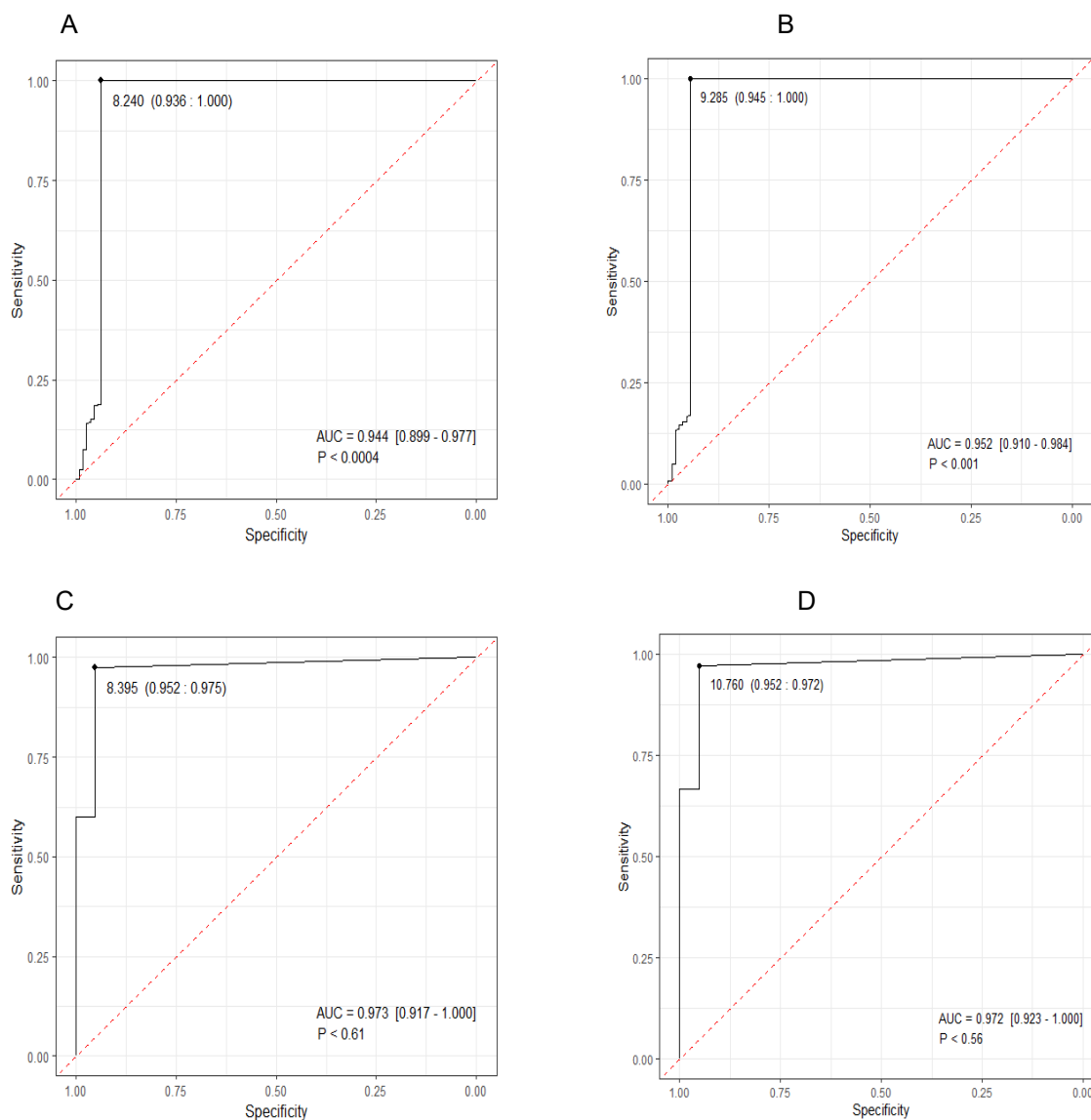


Figura Suplementar 2. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) e respectivos AUC (Area Under the Curve). A) Curva ROC para o alvo *ITS1* utilizando amostras de biópsia, AUC = 0,940 (IC 95%: 0,90 – 0,98, $p < 0,0004$). B) Curva ROC para o alvo *HSP70* utilizando amostras de biópsia, AUC = 0,950 (IC 95%: 0,91 – 0,98, $p < 0,001$). C) Curva ROC para o alvo *ITS1* utilizando amostras de imprint, AUC = 0,970 (IC 95%: 0,92 – 1,000, $p < 0,61$). D) Curva ROC para o alvo *HSP70* utilizando amostras de imprint, AUC = 0,970 (IC 95%: 0,92 – 1,000, $p < 0,56$).

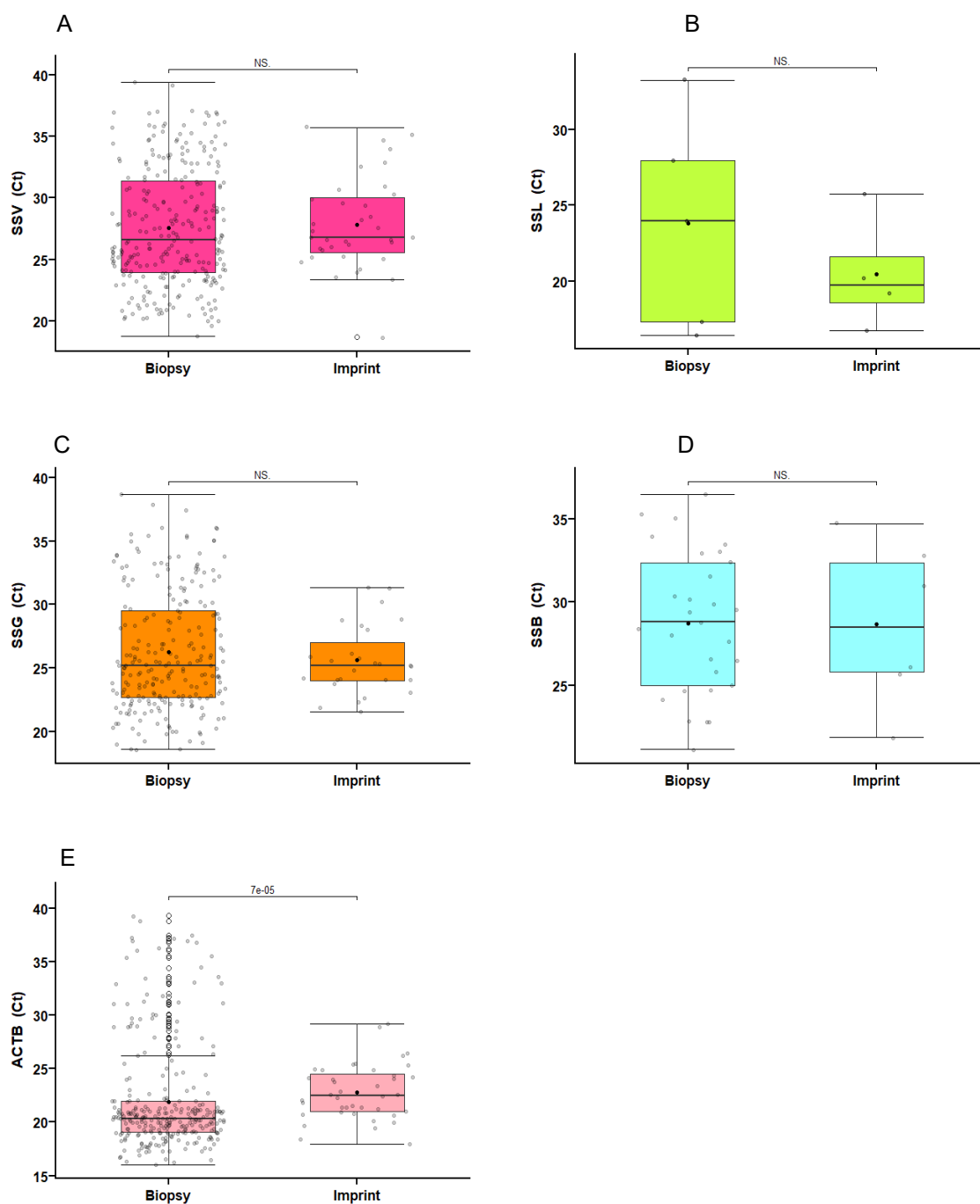


Figura Suplementar 3. Representação em boxplot dos valores de C_t com abordagem comparativa entre os métodos de amostragem. A) Comparação de VSS em biópsia e imprint (p = não significativo). B) Comparação de LSS em biópsia e imprint (p = NS). C) Comparação de SSG em biópsia e imprint (p = NS). D) Comparação de SSB em biópsia e imprint (p = NS). E) Comparação de ACTB em biópsia e imprint (p = 7e-05).

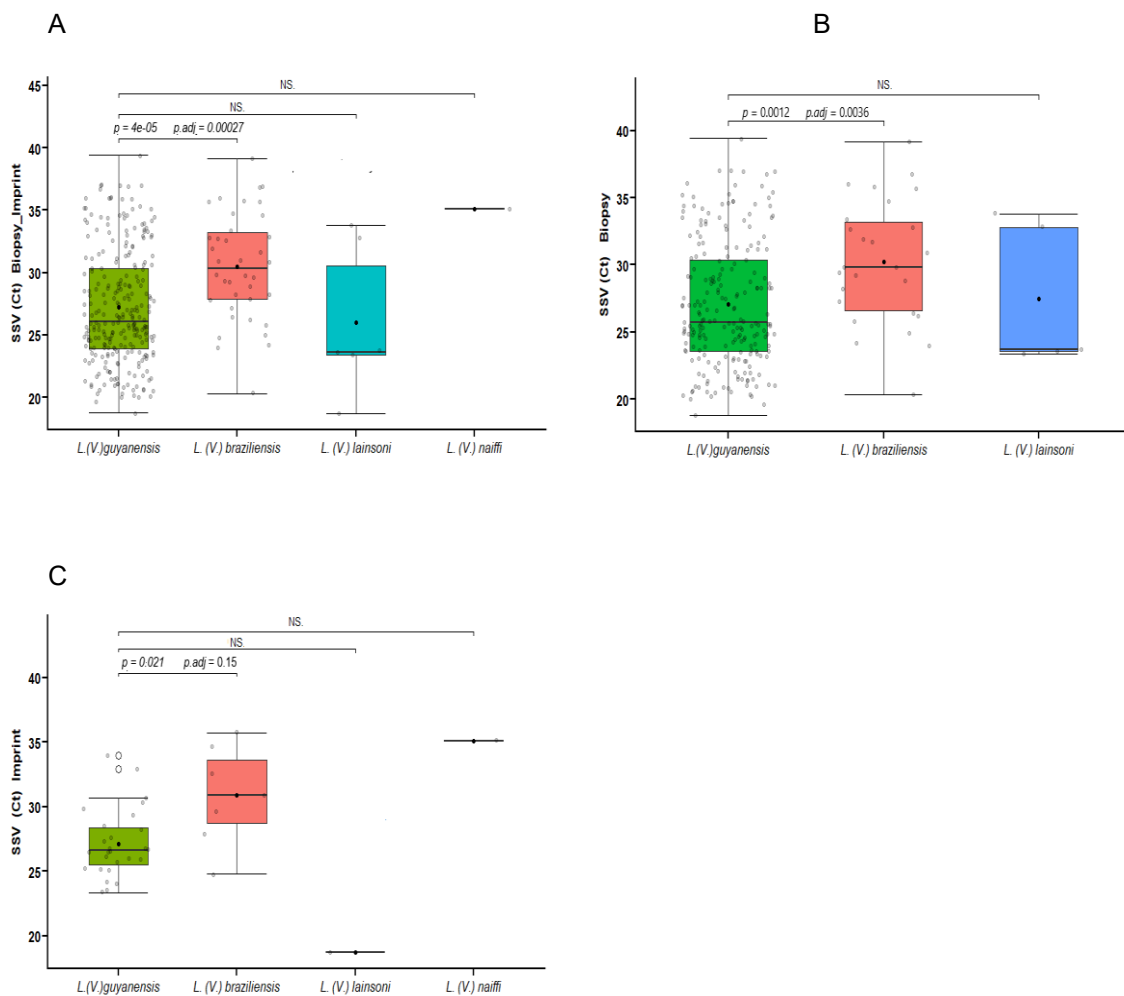


Figura suplementar 4. Representação em boxplot dos valores de Ct para SSV, com abordagem comparativa entre espécies de *Leishmania*. A) Comparação dos valores de C_t de VSS entre espécies de *Leishmania* utilizando amostras combinadas de biópsia e imprint (*L. (V.) guyanensis* vs *L. (V.) braziliensis*: $p = 4e-05$; $p_{ajustado} = 0.00027$; demais comparações: NS). B) Comparação dos valores de C_t de VSS entre espécies de *Leishmania* utilizando apenas amostras de biópsia (*L.(V.) guyanensis* vs *L. (V.) braziliensis*: $p = 0.0012$; $p_{ajustado} = 0.036$; demais comparações: NS). C) Comparação dos valores de C_t de VSS entre espécies de *Leishmania* utilizando apenas amostras de imprint (*L. (V.) guyanensis* vs *L. (V.) braziliensis*: $p = 0.021$; $p_{ajustado} = 0.15$; demais comparações: NS).

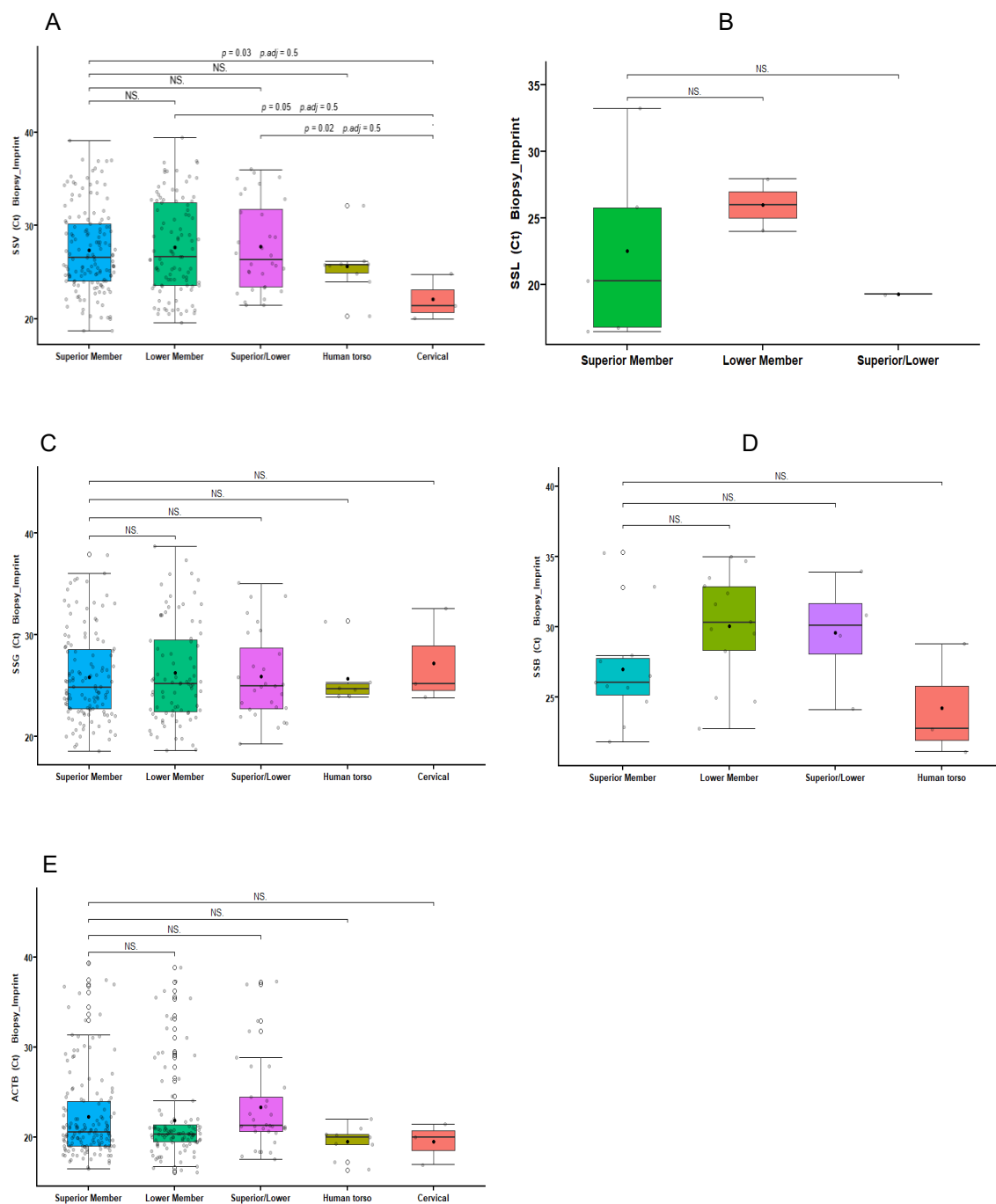


Figura suplementar 5. Representação em boxplot dos valores de C_t para marcadores moleculares em comparação com a localização da lesão em amostras de biópsia e imprint.. A) Comparação com valores de C_t de VSS (Membro superior vs cervical: $p = 0.03$; $p_{ajustado} = 0.5$; Membro inferior vs cervical: $p = 0.02$; $p_{ajustado} = 0.5$; demais comparações: NS). B) Comparação com valores de C_t de LSS (todas as comparações: NS). C) Comparação com valores de C_t de SSG (todas as comparações: NS). D) Comparação com valores

de C_t de SSB (todas as comparações: NS). E) Comparação com valores de C_t de ACTB (todas as comparações: NS).

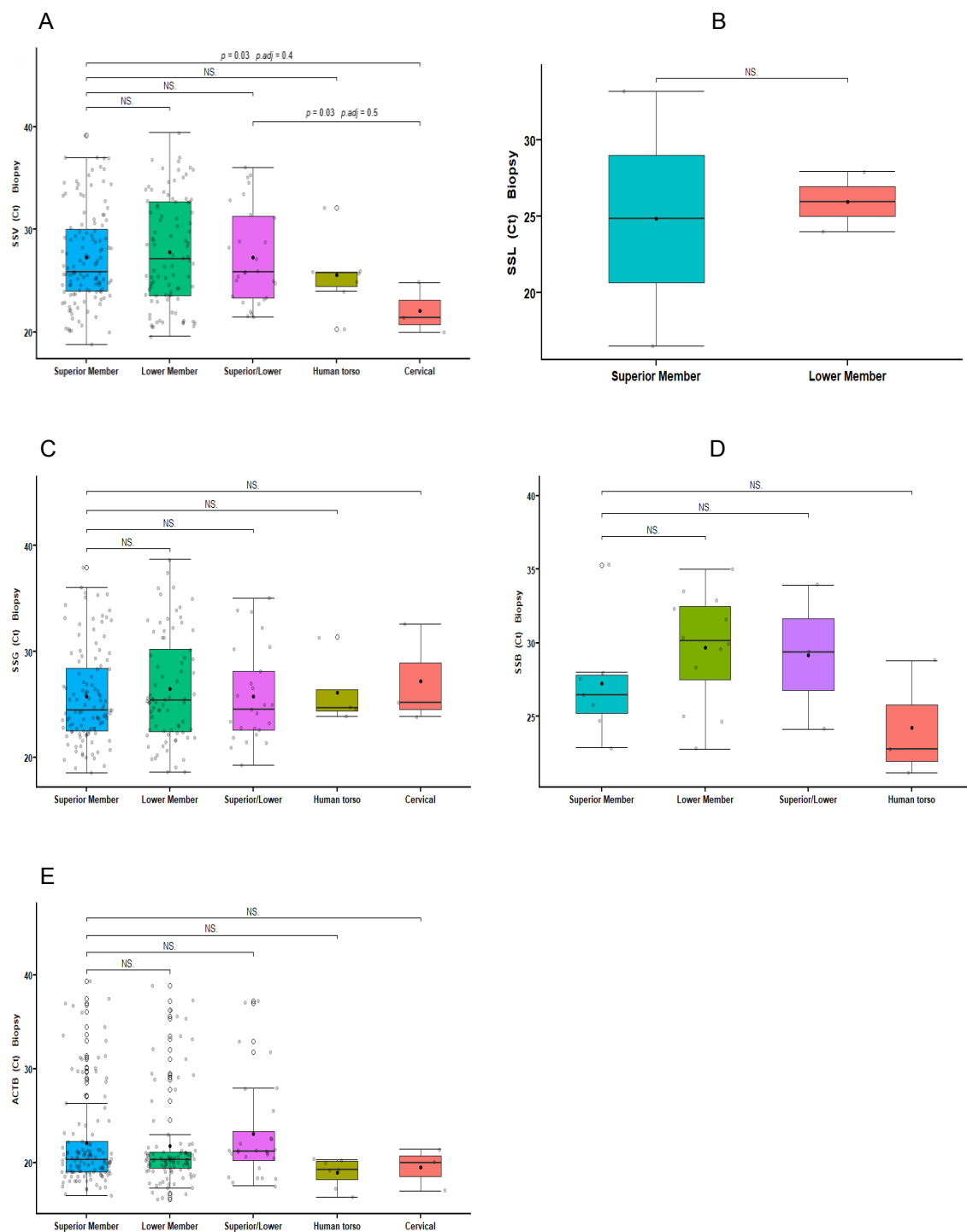


Figura Suplementar 6. Representação em boxplot dos valores de C_t para marcadores moleculares em comparação com a localização da lesão em amostras de biópsia. A) Comparação com valores de C_t de VSS (Membro superior vs cervical: $p = 0.03$; $p_{ajustado} = 0.5$; Membro inferior vs cervical: $p = 0.03$; $p_{ajustado} = 0.4$; Superior/Inferior vs cervical: $p = 0.03$; $p_{ajustado} = 0.5$; demais comparações: NS). B) Comparação com valores de C_t de LSS (todas as comparações: NS). C) Comparação com valores de C_t de SSG (todas as

comparações: NS). D) Comparação com valores de C_t de SSB (todas as comparações: NS). E) Comparação com valores de C_t de *ACTB* (todas as comparações: NS).7

21. APÊNDICE J - PROTOCOLO TÉCNICO LABORATORIAL DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* NO ESTADO DO AMAZONAS (CONTINUA)

PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* NO ESTADO DO AMAZONAS

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um grave problema de saúde pública no estado do Amazonas, Brasil, caracterizada por uma complexa epidemiologia e diversidade de espécies de *Leishmania*. A identificação precisa das espécies é crucial para o prognóstico, tratamento e vigilância epidemiológica. No Amazonas, as espécies mais prevalentes incluem *L. (Viannia) guyanensis*, responsável por aproximadamente 94% dos casos, seguida por *L. (V.) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi/lindbergi* (1).

A metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) direcionada aos genes *ITS1* e *HSP70* tem se mostrado uma ferramenta diagnóstica molecular robusta para a identificação de subgêneros e espécies de *Leishmania*. Estudos demonstram que a qPCR-ITS1 e a qPCR-HSP70 apresentam alta sensibilidade (99,7% e 99,6%, respectivamente) e especificidade (94% e 95%, respectivamente) para a detecção e diferenciação de *Leishmania*. A prevalência de espécies identificadas por esses métodos no Amazonas é de aproximadamente 83% para *L. (V.) guyanensis*, 12% para *L. (V.) braziliensis*, 3% para *L. (L.) amazonensis*, 1.7% para *L. (V.) lainsoni* e 0.3% para *L. (V.) naiffi*. Este protocolo detalha o fluxo de trabalho molecular para a identificação dessas espécies, visando padronizar e otimizar o diagnóstico na região.

MATERIAIS E AMOSTRAS

As amostras biológicas utilizadas para a extração de DNA consistem em biópsias de lesões cutâneas ou impressões em papel filtro, sendo quatro impressões por paciente. A extração de DNA genômico é realizada utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Para a amplificação e detecção por qPCR, utiliza-se o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). Como controles, são empregados um pool de DNA de *Leishmania* positivo e um controle negativo sem molde (NTC - *No Template Control*), utilizando água ultrapura. O gene da ACTB humana

serve como controle de referência para avaliar a qualidade do DNA e a presença de inibidores da PCR. Todos estes procedimentos de biologia molecular foram realizados no laboratório de biologia molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM).

FLUXO DE TRABALHO (FIGURA S1)

DNA extraído de biópsias ou papel filtro de pacientes com suspeita de LTA.

- Se detectado o subgênero *Leishmania* (LSS) por meio da qPCR-*ITS1*, a amostra é submetida ao sequenciamento de um fragmento de DNA do gene *HSP70*, com o propósito de confirmar a espécie *L. (L.) amazonensis*.
- Se detectado o subgênero *Viannia* (VSS) por meio da qPCR-*ITS1*, a amostra é submetida à qPCR-*HSP70*, para identificação das espécies *L. (V.) guyanensis* (SSG) ou *L. (V.) braziliensis* (SSB).
- Em caso de resultado negativo na qPCR-*HSP70* para essas espécies, é realizada um sequenciamento de um fragmento de DNA do gene *HSP70* para identificação de espécies de baixa frequência como *L. (V.) lainsoni* ou *L. (V.) naiffi*.

REAÇÃO DA qPCR

Cada reação de qPCR é preparada em um volume final de 10 μ L, contendo: TaqMan™ Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG [1 \times], 300 nM de cada primer, 100 nM da sonda específica e 2 μ L de DNA molde (com concentração entre 25-50 ng/ μ L). O programa de ciclagem consiste em 40 ciclos de amplificação, com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Uma amostra é considerada positiva quando sua curva de amplificação cruza o limiar (threshold) de 0.02, gerando um valor de C_t (Cycle threshold).

Os primers e a sonda para a detecção do subgênero *Viannia* são:

- Primer Forward (F): 5'-GGAGGCTTGTGTTTTCTAGCAAG-3'.
- Primer Reverse (R): 5'-ATATGTAAACGTCGATCGGCCT-3'.
- Sonda (Probe): 5'-CACAGATACGCAATACAAT-3'(VIC/MGB).

Os primers e a sonda para a detecção do subgênero *Leishmania* são:

- Primer Forward (F): 5'-ATGGCCGATCGACGTTATAGC-3'.
- Primer Reverse (R): 5'-AGCCGTTATCCACACACGC-3'.

- Sonda (Probe): 5'-AATGCCCGTTTCAATAC-3'(FAM/MGB).

Os primers comuns para a amplificação da região *HSP70* são:

- Primer Forward (F): 5'-AGGCCGACAAGATGCAGC-3'.
- Primer Reverse (R): 5'-AGCTTGCCGGACACGTTC-3'.

As sondas específicas para cada espécie são:

- Sonda SSG (*L. (V.) guyanensis*): 5'-AAGAACACGATCGCCG-3' (VIC/MGB).
- Sonda SSB (*L. (V.) braziliensis*): 5'-TGAAGAACACGGTCTCC-3' (FAM/MGB).

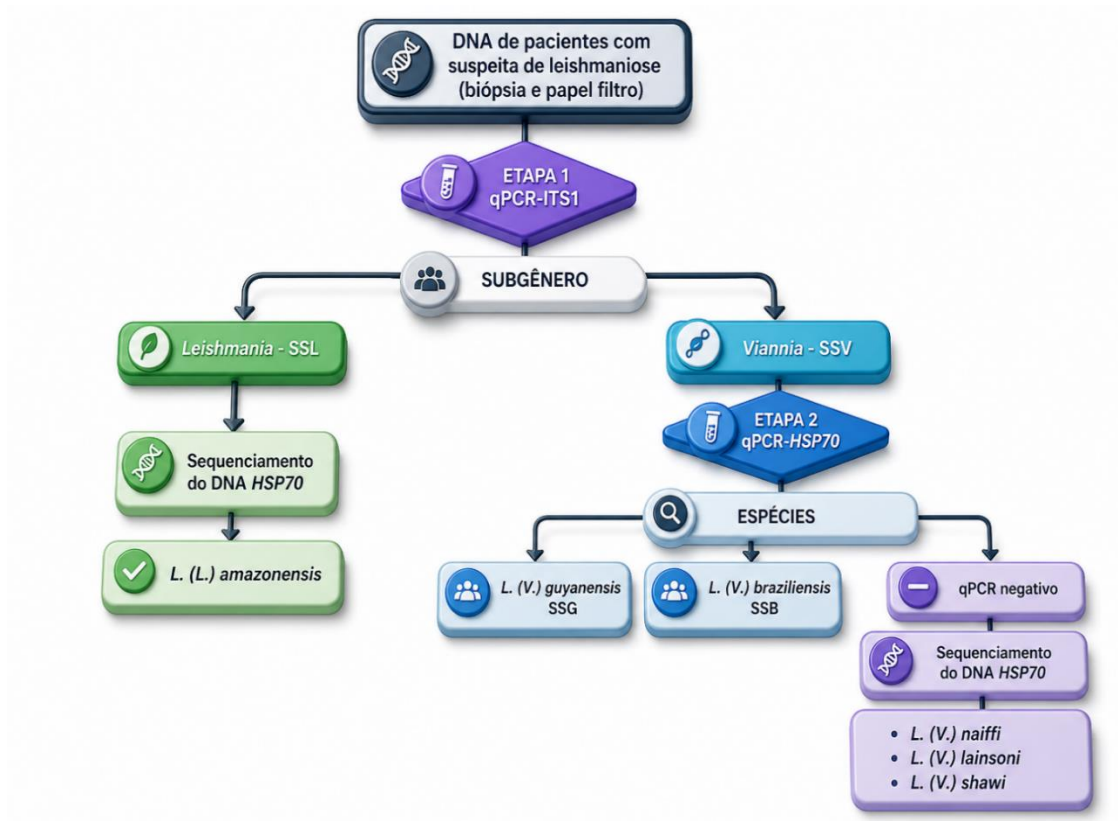
SEQUENCIAMENTO *HSP70*

Para o sequenciamento da região *HSP70*, uma reação de PCR inicial é realizada em um volume de 20 µL, contendo: 0.3 µM de cada primer (F: 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e R: 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3') (2), 1× Platinum Hot Start PCR Mastermix e 5 µL de DNA molde (10-40 ng). Os primers amplificam um fragmento de 234 bp. O programa de ciclagem é: 94°C por 5 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

REFERÊNCIAS

- 1 - Benicio E de A, Nunes Gadelha EP, Talhari A, Silva Jr RM da, Ferreira LC, Santos MCC dos, Mira MT, Oliveira CMC de, Talhari C, Talhari S, Machado PR, Schrieffer A. 2011. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86.
- 2 - da Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MP de O, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. 2012. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107.

ANEXO DO PROTOCOLO



22. APÊNDICE K – ARTIGO SUBMETIDO



The banner features the American Society for Microbiology logo on the left, a central image of the Microbiology Spectrum journal cover, and the ASM eJP Peer Review System logo on the right. Below the banner is a red navigation bar with the following links: Lar, Ajuda para autores, Ajuda para avaliadores, Contate-nos, and Sair.

Este é um manuscrito transferido. As notas podem incluir informações adicionais.

Manuscrito nº	Espectro00392-26
Revisão atual nº	0
Data de envio	2026-02-02 09:55:25
Estágio atual	Em revisão por pares.
Título	Desenvolvimento e validação de ensaio molecular utilizando os genes ITS1 e HSP70 como alvos para a identificação de espécies de Leishmania em leishmaniose cutânea americana no estado do Amazonas, Brasil.
Tipo de manuscrito	Artigo de pesquisa
Seção Especial	N / D
Autor correspondente	Felipe Jules de Araújo Santos (Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia, Universidade do Estado do Amazonas)
Autores Colaboradores	Felipe Jules de Araújo Santos (corr-auth), Dr. Pennini, Sinésio Talhari, Maria das Graças Barbosa Guerra, Jorge Guerra, Dra.