



## METANÁLISE: IDENTIFICAÇÃO DE PRIMERS PARA DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM CHAGASI* E DA *L. (VIANNIA) BRAZILIENSIS*)

VASSALO, Kaline Ribeiro de Almeida<sup>1</sup>; MINHARRO, Silvia<sup>2</sup>;

### RESUMO

As leishmanioses representam importante desafio em saúde pública. O diagnóstico da *Leishmania* spp. de forma precoce e precisa é essencial, mas os métodos convencionais apresentam baixa sensibilidade. As técnicas moleculares, especialmente a PCR, surgem como ferramentas promissoras pela maior acurácia e capacidade de diferenciação entre espécies. O objetivo desse trabalho foi identificar, pela revisão sistemática e metanálise, os primers de maior sensibilidade e especificidade para detecção do DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. Seis estudos foram selecionados pelos critérios de elegibilidade. A qualidade metodológica foi avaliada pelas ferramentas QUADAS-2 e STARD, e a análise estatística realizada no software RevMan 5. A PCR apresentou desempenho superior aos métodos convencionais, com sensibilidade entre 0,37 e 1,00 e especificidade de até 0,95. O alvo kDNA minicircle demonstrou melhor desempenho global, seguido pelos genes ITS1 e HSP70, que se destacaram na diferenciação de espécies.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Diagnóstico Molecular. PCR.

### I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma zoonose de relevância mundial e importante problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais. O diagnóstico precoce é fundamental para o controle e o tratamento, mas ainda enfrenta limitações pela falta de

---

1 Voluntário do Programa de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Faculdade de Ciências da Saúde. [kaline.vassallo@ufnt.edu.br](mailto:kaline.vassallo@ufnt.edu.br).

2 Orientadora do Programa de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências da Saúde. e-mail: [silvia.barbosa@ufnt.edu.br](mailto:silvia.barbosa@ufnt.edu.br)



padronização entre os métodos disponíveis. As técnicas moleculares, especialmente a PCR, surgem como ferramentas promissoras pela maior acurácia e capacidade de diferenciação entre espécies.

Diante disso, este estudo por meio de uma revisão sistematizada com metanálise buscou identificar os primers de maior sensibilidade e especificidade utilizados em testes moleculares, visando à padronização e ao aprimoramento do diagnóstico da doença, em especial pela reação em cadeia da polimerase (PCR), na detecção do DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *L. (Viannia) braziliensis*, principais espécies causadoras das formas visceral e tegumentar no Brasil.

## II. BASE TEÓRICA

A leishmaniose é uma doença infecciosa e parasitária de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e constitui importante problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Manifesta-se clinicamente nas formas cutânea, mucocutânea e visceral (VERONESI; FOCACCIA, 2015). A identificação da espécie é essencial para o diagnóstico e o manejo adequado, porém a diferenciação morfológica entre as espécies é complexa e demorada (GOMES *et al.*, 2006).

Dentre os métodos disponíveis, as abordagens moleculares, a PCR, tornou-se ferramenta fundamental no diagnóstico da leishmaniose, por possibilitarem a detecção direta do DNA parasitário com elevada sensibilidade e especificidade (NOLETO *et al.*, 2017). O desenvolvimento de primers direcionados a diferentes regiões do genoma de *Leishmania* tem permitido aprimorar a acurácia diagnóstica, a diferenciação entre espécies e o monitoramento epidemiológico das infecções (MARY *et al.*, 2004; VAN EYS *et al.*, 1992). A literatura científica recente reforça que o desempenho diagnóstico das técnicas moleculares varia conforme o alvo genético selecionado, o tipo



de amostra biológica e o protocolo de amplificação utilizado. Assim, a escolha do primer adequado é determinante para garantir a confiabilidade dos resultados e a padronização entre os estudos (CALDAS *et al.*, 2020; TANIDA *et al.*, 2021).

### III.OBJETIVOS

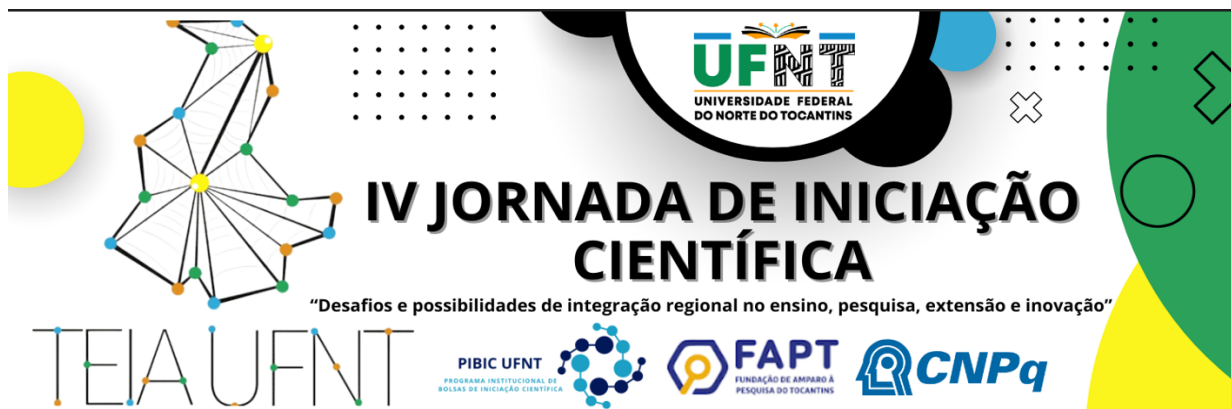
O estudo teve como objetivo geral identificar, por meio de revisão sistematizada e metanálise, os primers de maior sensibilidade e especificidade utilizados na detecção do DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *L. (Viannia) braziliensis*.

### IV.METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão sistematizada com metanálise de acurácia diagnóstica, conduzida conforme o *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy* (HIGGINS; THOMAS, 2022) e as *Diretrizes Metodológicas para Revisões Sistemáticas e Metanálises de Estudos de Acurácia Diagnóstica* do Ministério da Saúde (Brasil, 2014), e registrada na base PROSPERO sob o número CRD42024522728.

Foram incluídos estudos publicados sobre diagnóstico molecular de leishmaniose humana, envolvendo *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *L. (Viannia) braziliensis*. As buscas ocorreram nas bases PubMed/MEDLINE, EMBASE, SciELO e BVS/LILACS, utilizando os descritores “*Leishmania braziliensis*”, “*Leishmania infantum*”, “molecular diagnostics” e “PCR”, combinados por operadores booleanos.

Selecionaram-se estudos que apresentaram dados de sensibilidade, especificidade ou tabelas 2x2 (VP, FP, VN, FN), comparando a PCR ou suas variações ao teste de referência. Foram excluídos duplicados, revisões narrativas, estudos incom-



pletos ou sem descrição dos primers. A triagem foi realizada de forma pareada e independente no Rayyan®, e a qualidade metodológica avaliada pelas ferramentas QUADAS-2 e STARD.

Os dados foram organizados em planilha Excel® e analisados no RevMan 5.4 (COCHRANE COLLABORATION, 2020), aplicando modelo de efeitos aleatórios, intervalo de confiança de 95% e testes de Cochran (Q) e  $I^2$  para heterogeneidade. Por utilizar apenas dados secundários, o estudo foi dispensado de aprovação ética.

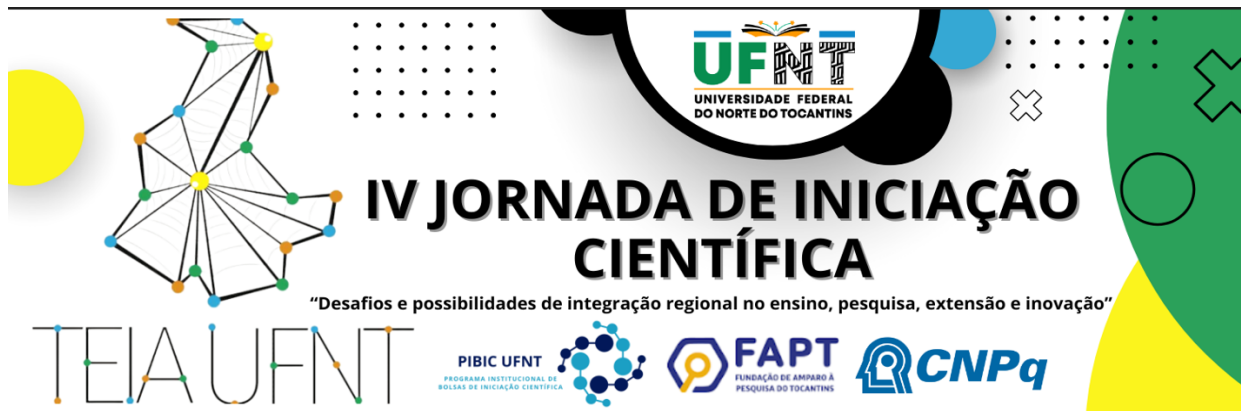
## V.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados pelos critérios, seis estudos (GOMES *et al.*, 2014; IBARRA-MENESES *et al.*, 2021; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013; MOUTTAKI *et al.*, 2014; SUÁREZ *et al.*, 2015; TOZ *et al.*, 2013.) foram incluídos na análise final.

A avaliação metodológica conduzida pelas ferramentas QUADAS-2 e STARD demonstrou baixo risco de viés na maioria dos estudos, com incertezas pontuais apenas nos domínios de seleção de pacientes e padrão de referência, sem impacto relevante sobre os resultados globais (WHITING *et al.*, 2011; OLIVEIRA; GOMES; TOSCANO, 2011).

A metanálise evidenciou superioridade da PCR em relação aos métodos convencionais de diagnóstico, com sensibilidade variando entre 0,37 e 1,00 e especificidade de 0,00 a 0,95, refletindo diferenças de amostras e alvos genômicos. O minicirculo de kDNA apresentou o melhor desempenho global, com sensibilidade acima de 95% e especificidade de até 100%, sendo o marcador mais confiável para detecção de *Leishmania* spp (GOMES *et al.*, 2014; SUÁREZ *et al.*, 2015).

Os alvos ITS1 e HSP70 demonstraram sensibilidade menor, porém maior capacidade de diferenciação entre espécies, especialmente em regiões onde coexistem *L. braziliensis* e *L. infantum* (TOZ *et al.*, 2013; MOUTTAKI *et al.*, 2014). A combinação de alvos gênicos, como HSP70 e 18S rDNA, apresentou acurácia próxima de 98,5%,



reforçando que estratégias multi-alvo aumentam a confiabilidade diagnóstica e reduzem o risco de falsos negativos (FILGUEIRA *et al.*, 2020).

## VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metanálise realizada demonstrou que a utilização de métodos moleculares baseados na PCR apresenta desempenho superior aos testes convencionais no diagnóstico das leishmanioses, destacando o minicírculo de *kDNA* como alvo de maior sensibilidade e os genes *ITS1* e *HSP70* como marcadores complementares para diferenciação entre espécies. Os resultados reforçam a importância de investir em técnicas moleculares aplicáveis à rotina laboratorial e à vigilância epidemiológica, contribuindo para o diagnóstico precoce e o controle da doença.

## VII. REFERÊNCIAS

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia.** Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos de acurácia diagnóstica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 116 p.

CALDAS, S. *et al.* Quantitative PCR for canine visceral leishmaniasis using lymph node, bone marrow and conjunctival swab samples. **Parasitology Research**, v. 119, n. 9, p. 3065–3073, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06861-1.

COCHRANE COLLABORATION. **Review Manager (RevMan) [Computer program]**. Version 5.4. The Cochrane Collaboration, 2020. Disponível em: <https://training.cochrane.org/online-learning/core-software/revman>. Acesso em: [25 de fev. de 2025].

FILGUEIRA, C. P. B. *et al.* Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, e0008750, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008750.



GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 234–241, 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.09.006.

GOMES, C. M. et al. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 902–908, 2014. DOI: 10.1128/JCM.02720-13.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Allows Rapid, Simple and Accurate Molecular Diagnosis of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* When Compared to PCR. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 610, 2021.

HIGGINS, J. P. T.; THOMAS, J. (org.). **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy**. 2. ed. London: The Cochrane Collaboration, 2022.

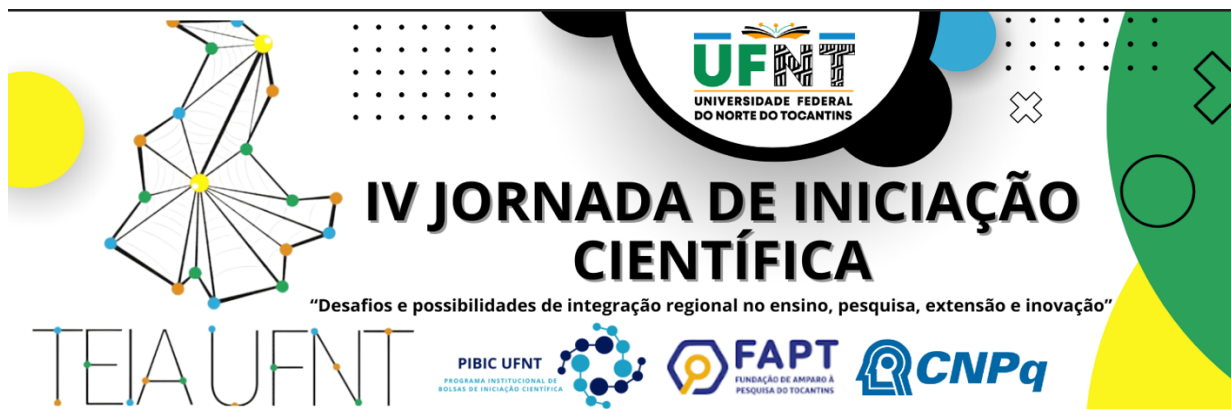
MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004.

MOHAMMADIHA, A. et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, v.133, p.89-94, 2013.

MONTALVO, A. M. et al. Three new sensitive and specific heat shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 1453–1461, 2012. DOI: 10.1007/s10096-011-1463-z.

MOUTTAKI, T. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 420, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-420.

NOLETO, R. V. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 2–6, 2017.



OLIVEIRA, G. M.; GOMES, M. J.; TOSCANO, C. M. **Diretrizes metodológicas para estudos de acurácia de testes diagnósticos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of *Leishmania* (Viannia) kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and inter-sampling variability in parasite load. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, e0003936, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003936.

TANIDA, K. et al. Comparison of three in-house real-time PCR assays targeting kinetoplast DNA, the small subunit ribosomal RNA gene and the glucose-6-phosphate isomerase gene for the detection of *Leishmania* spp. in human serum. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 826, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10070826.

TOZ, S. O. et al. A real-time ITS1-PCR-based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, e2205, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002205.

VAN EYS, G. J. J. M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992. DOI: 10.1016/0166-6851(92)90211-R.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

WHITING, P. F. et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 8, p. 529–536, 2011. DOI: 10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009

## VIII. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), por meio do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC), pelo apoio e incentivo à realização deste estudo. Expresso também minha sincera gratidão à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Silvia Minharro Barbosa Prado, pelos ensinamentos, incentivo e acompanhamento durante todas as etapas da pesquisa.