



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

RHAYANNY KETHYLLY PEREIRA SANTOS

**ANÁLISE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA:
UMA REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA**

Recife
2023

RHAYANNY KETHYLLY PEREIRA SANTOS

**ANÁLISE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA:
UMA REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Walter Lins Barbosa
Júnior.

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Rhayanny Kethylly Pereira.

Análise dos métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana: Uma revisão narrativa da literatura. / Rhayanny Kethylly Pereira Santos. - Recife, 2023.

42 p. : il., tab.

Orientador(a): Walter Lins Barbosa Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Ferramentas moleculares. 2. Leishmaniose visceral humana. 3. Diagnóstico. 4. Sensibilidade. 5. Especificidade. I. Barbosa Junior, Walter Lins. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

RHAYANNY KETHYLLY PEREIRA SANTOS

**ANÁLISE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA:
UMA REVISÃO NARRATIVA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Walter Lins Barbosa Júnior
Instituto Aggeu Magalhães/Departamento de Parasitologia

Prof. Dr. André de Lima Aires
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Medicina Tropical

Profa. MSc. Amanda Virginia Batista Vieira
Instituto Aggeu Magalhães/Departamento de Parasitologia

AGRADECIMENTOS

A Deus por fortalecer-me todos os dias e pela graça de alcançar mais uma conquista, estando presente e guiando-me a cada desafio.

Ao Dr. Walter, um exemplo ímpar de orientador, por aceitar o cargo, disponibilizar seu tempo, paciência e conhecimento, restabelecendo a motivação necessária para que eu chegasse até o fim.

A todos os professores pelas aulas e debates que fundamentaram e enriqueceram minha visão profissional, cada um com sua particularidade.

Agradeço a equipe do Laboratório Zeferino Veloso, por me acolherem como uma família, com abraços e sorrisos. Sobretudo, agradeço os ensinamentos e oportunidades de desenvolvimento que emocionaram-me.

Sou grata, também, aos familiares e amigos que tornaram possível a realização deste sonho, especialmente a minha mãe do coração Rute Gonçalves e a minha prima e irmã Nathália Lídia, responsáveis por me apresentar esse caminho tão rico de aprendizados, todo o meu carinho e gratidão. A meus pais e irmãos pela resiliência promovida e por alegrarem-se comigo nas vitórias.

Agradeço imensamente às minhas companheiras de caminhada que muito admiro e torço pelo sucesso, Victória Regina da Silva e Gabriela Rodrigues Aguiar Leal, pela linda amizade que construímos durante todo o curso e agora para a vida, pelos conselhos, por chorarem e sorrirem comigo, por serem minha base sempre que preciso, a vocês, todo meu amor e apreço, meninas.

Finalmente, ao maior incentivador e companheiro que impulsionou, antes mesmo do pré-vestibular, o meu ingresso na área e não mediu esforços para que eu concluísse todas as etapas, sacrificialmente, quando nem eu pensava ser possível concluir. Ao meu noivo Jackson, sou imensamente grata, você faz parte do êxito de toda essa jornada.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muita, nos aproxima”

Louis Pasteur

SANTOS, Rhayanny Kethylly Pereira. **Análise dos métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana**: Uma revisão narrativa da literatura. 2023. 42 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* que, a depender da espécie, resulta em manifestações clínicas, tratamentos e prognósticos diferentes. Trata-se de uma doença tropical negligenciada e, por representar alta taxa de letalidade em humanos e ampla distribuição geográfica de transmissão vetorial, tornam-se necessários métodos de diagnóstico mais eficazes que auxiliem no bom prognóstico do paciente. A partir das ferramentas diagnósticas já empregadas, como exame parasitológico direto e métodos imunológicos, o diagnóstico molecular é considerado bastante promissor, pois são robustos e oferecem boa especificidade e sensibilidade. Desse modo, o objetivo deste estudo foi analisar as ferramentas para diagnóstico molecular da LVH a partir de uma revisão narrativa da literatura, discutindo variáveis como especificidade e sensibilidade, além da viabilidade diagnóstica. A metodologia foi estruturada a partir da construção de uma revisão narrativa da literatura, por meio da busca por estudos clínicos e experimentais em bases de dados (PubMed, Scielo e MEDLINE). Foram incluídos os estudos que expõem dados relacionados apenas à infecção na forma LVH e que foram publicados no período entre 2018 e 2023. Seis artigos foram selecionados, dos quais quatro realizaram a análise molecular pesquisando o DNA da espécie *Leishmania infantum* (Espanha, Brasil e Etiópia) e dois para *Leishmania donovani* (Bangladesh e Sudão). A principal ferramenta molecular empregada nos trabalhos foi o LAMP e alvo mais explorado na literatura foi a região 18S ribossomal, componente da pequena subunidade ribossômica eucariótica. Cinco artigos utilizaram o sangue periférico como principal amostra biológica para a realização dos ensaios moleculares e, apenas um, a urina. A sensibilidade e especificidade encontradas nos artigos variaram de 92-100% e 96-100%, respectivamente. Dessa forma, a utilização do LAMP na rotina precisa ser adaptada para a condição de campo, uma vez que ainda é necessária uma etapa prévia de extração do material genético.

Palavras-chave: Ferramentas moleculares. Leishmaniose visceral humana. Diagnóstico. Sensibilidade. Especificidade.

SANTOS, Rhayanny Kethylly Pereira. **Analysis of molecular methods for the diagnosis of human visceral leishmaniasis**: A narrative review of the literature. 2023. 42 sheets. Completion of course work (Graduate in Biomedicine) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Human Visceral Leishmaniasis (HVL) is caused by obligate intracellular protozoa of the genus *Leishmania* that, depending on the species, results in different clinical manifestations, treatments and prognoses. It is a neglected tropical disease and, due to its high lethality rate in humans and wide geographical distribution of vectorial transmission, more effective diagnostic methods are needed to help in the good prognosis of the patient. From the diagnostic tools already employed, such as direct parasitological examination and immunological methods, molecular diagnosis is considered very promising, because they are robust and offer good specificity and sensitivity. Thus, the objective of this study was to analyze the tools for molecular diagnosis of VLH based on a narrative review of the literature, discussing variables such as specificity and sensitivity, as well as diagnostic feasibility. The methodology was structured from the construction of a narrative review of the literature by searching for clinical and experimental studies in databases (PubMed, Scielo and MEDLINE). Studies that expose data related only to infection in the LVH form and that were published in the period between 2018 and 2023 were included. Six papers were selected, of which four performed molecular analysis by searching for DNA of the *Leishmania infantum* species (Spain, Brazil, and Ethiopia) and two for *Leishmania donovani* (Bangladesh and Sudan). The main molecular tool employed in the papers was LAMP and the most explored target in the literature was the 18S ribosomal region, a component of the eukaryotic small ribosomal subunit. Five articles used peripheral blood as the main biological sample for molecular assays, and only one used urine. The sensitivity and specificity found in the articles ranged from 92-100% and 96-100%, respectively. Thus, the routine use of LAMP needs to be adapted to field conditions, since a previous step of extraction of genetic material is still necessary.

Keywords: Molecular tools. Human visceral leishmaniasis. Diagnosis. Sensitivity. Specificity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estado de endemidade da Leishmaniose Visceral Humana em todo o mundo	15
Figura 2	Adulta fêmea da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	17
Figura 3	Ciclo biológico da leishmaniose visceral humana	18
Figura 4	Criança com hepatoesplenomegalia decorrente da LVH	19
Figura 5	Fluxograma da busca em banco de dados	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Trabalhos seleccionados para a revisão narrativa da literatura	30
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
Covid-19	Corona virus disease
DAT	<i>Direct agglutination test</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ITS1	Inner Transcribed Spacer 1
kDNA	DNA Kinetoplast
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop
LIT	Liver Infusion Tryptose
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
NNN	<i>Novy-MacNeal-Nicolle</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	PCR quantitativo
rDNA	DNA ribossomal
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
Sars-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SSU rRNA	<i>Small Subunit ribosomal Ribonucleic Acid</i>
TGI	Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Humana	14
2.2 Ciclo Biológico	16
2.3 Aspectos Clínicos	18
2.4 Tratamento	20
2.5 Diagnóstico Laboratorial	20
2.5.1 Exames parasitológicos	21
2.5.2 Diagnóstico imunológico	22
2.5.3 Diagnóstico molecular	24
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 METODOLOGIA	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é uma antropozoonose tropical negligenciada, altamente letal e apresenta endemicidade em 76 países do globo terrestre. É causada pelo protozoário *Leishmania* e atinge anualmente 2 milhões de pessoas no mundo. Na América Latina, 12 países são considerados endêmicos, dentre esses, foi o Brasil que, em 2021, registrou 93,5% dos casos de LVH, representativamente no sexo feminino da população infantil (> 5 anos) e no sexo masculino na fase adulta (> 20 anos). No país, a região mais afetada pela doença é a Nordeste (OCAMPO, 2021; OPAS, 2022).

Leishmania é um parasito intracelular, de ciclo biológico digenético e sua transmissão ocorre, no Brasil, por meio da fêmea do flebotomíneo popularmente conhecido como mosquito-palha *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae da subfamília Phlebotominae). Ao alimentar-se do sangue do hospedeiro, o inseto inocula formas promastigotas do protozoário presentes em sua probóscide, quando previamente infectado, em razão da ingestão de macrófagos preenchidos de amastigotas (BRASIL, 2006). Ao alcançar a corrente sanguínea, o agente etiológico atinge órgãos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear, como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BASTOS *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas incluem febre persistente, anemia, fraqueza, artralgia, hepatomegalia e esplenomegalia, acompanhados de perda de peso, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Pelo fato dos indivíduos apresentarem sintomas gerais, o diagnóstico pode ser confundido com outras doenças de semelhantes manifestações, além da possibilidade da coexistência de casos de coinfeção pelo vírus da Covid-19 (COLOMBA, 2022). Além disso, há casos de coinfeção com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), visto que a imunossupressão torna o paciente ainda mais suscetível. Portanto, nesses casos, recomenda-se o rastreamento do HIV em paralelo ao diagnóstico da LVH. Há, ainda, quadros de pacientes assintomáticos que, aliados à subnotificação da doença, preocupam autoridades que buscam erradicar-la (BURZA, 2018; OMS, 2021).

A terapia principal é a monoterapia com antimoniais pentavalentes, disponível em duas formulações: estibogluconato de sódio e meglumina antimoníaco, porém,

possuem alta toxicidade e risco de tolerância. Para os infectados com HIV, na Ásia e na África têm-se que utilizar a terapia retroviral independente da contagem de CD4 (BURZA, 2018). A partir disso, a droga de primeira escolha no tratamento convencional é a anfotericina B em sua forma lipossomal, intravenosa, visto que apresenta menor toxicidade em comparação ao desoxicolato (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O padrão ouro para diagnóstico da LVH é o exame parasitológico direto. Em razão do trofismo do parasito, para microscopia, as amostras são adquiridas de forma invasiva, uma vez que são requisitados aspirados de baço, gânglio linfático ou medula óssea. Esse método pode ser realizado a partir da visualização direta do parasito ou pela cultura, contendo elevada sensibilidade e especificidade (ERBER *et al.*, 2022).

Em relação aos métodos imunológicos, o teste rápido é uma opção de escolha, pois é realizado de modo simples, sem precisar de mão de obra especializada e o resultado é obtido em menos de 15 minutos (LSH Ab ECO®). No entanto, apresenta sensibilidade e especificidade limitadas, resultantes de reações inespecíficas (FREIRE, 2018). O teste de aglutinação direta (DAT) pode ser útil para diagnosticar concomitantemente às outras técnicas, já que demonstra títulos baixos em controles endêmicos saudáveis. DAT é direcionado para o diagnóstico em casos de alta titulação, mesmo sendo limitado quanto à fragilidade do antígeno e não padronização da técnica. A urina de pacientes com LVH também foi empregada em teste de aglutinação de látex (KATEX), que apresentou alta sensibilidade e especificidade à frente de testes sorológicos (SUNDAR *et al.*, 2002).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é um teste imunoenzimático também utilizado para a detecção da LVH; no entanto, pode resultar em falsos positivos a depender do antígeno empregado no teste (ELSHAFIE *et al.*, 2016). Ademais, também são empregados testes imunofluorescentes que reconhecem antígenos presentes no cinetoplasto e membrana do parasito que, apesar de serem menos invasivos por utilizarem soro, apresentam alta sensibilidade, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os testes baseados na detecção de anticorpos não conseguem diferenciar quando se trata de uma infecção passada ou recente. Além disso, em crianças e imunocomprometidos, sua sensibilidade tende a ser reduzida (ERBER *et al.*, 2022).

Devido a ampla distribuição geográfica de transmissão, há a necessidade do diagnóstico ser realizado em tempo ágil e com o menor volume de amostra possível, para isso, as técnicas baseadas em DNA têm sido amplamente estudadas (VIEIRA *et al.*, 2021; GALLUZZI *et al.*, 2018). A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica de biologia molecular altamente específica e sensível, ideal para diferenciar recaída e reinfeção em pacientes em tratamento. Essa técnica amplifica sequências conservadas contidas no DNA de *Leishmania* spp. e, quando comparada a técnicas menos robustas, como a microscopia para a pesquisa de parasitos em amostras aspiradas, oferece maior sensibilidade, alcançando 96% quando o DNA do parasita é obtido a partir de sangue total. A PCR é aplicada, ainda mais, como teste de triagem para detectar carga parasitária no sangue periférico de imunocomprometidos (SUNDAR *et al.*, 2002). A LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop) é uma adaptação da técnica de PCR, cuja diferenciação deve-se ao emprego de múltiplos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e por ser isotérmica, visando aumentar a sensibilidade e especificidade, quando comparada com a microscopia e PCR (AQUINO, 2020). Mediante os métodos expostos, o diagnóstico baseado em ferramentas moleculares demonstra ser pertinente e vantajoso em comparação às comumente empregadas para o diagnóstico da LVH, portanto, é fundamental discutir novos métodos moleculares para diagnóstico da infecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

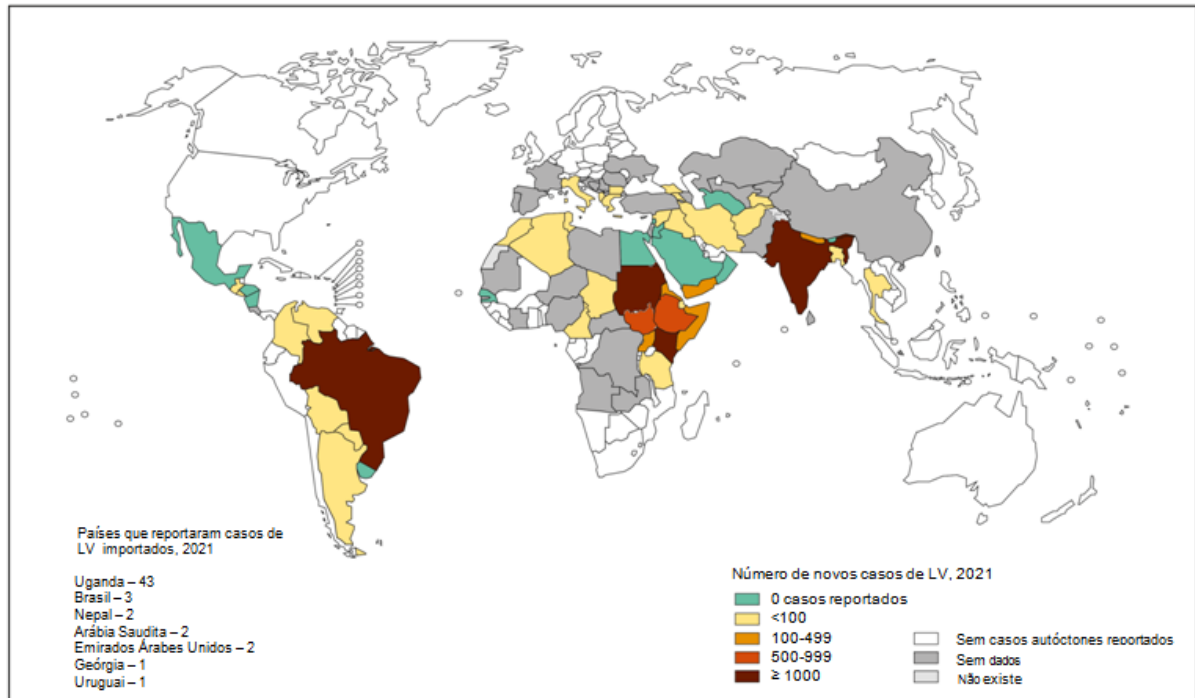
A leishmaniose visceral humana é uma forma clínica das leishmanioses que debilita órgãos e tecidos, além de ser uma das parasitoses que mais evoluem para o óbito no mundo. Visto que essa doença possui ampla distribuição geográfica, faz-se necessário compreender as características dessa doença.

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

A LVH é uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo e foi a segunda causa de morte por parasitoses, em 2013, quando em primeiro lugar era a malária (SALEM *et al.*, 2016). Observa-se alta endemicidade em 76 países, sendo a maioria dos casos no leste da África, Brasil e Índia (Figura 1), em que Etiópia,

Sudão, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão abrangeram 90% dos casos mundiais de LVH, no ano de 2015. Epidemias na África e Índia evidenciaram a gravidade fisiopatológica da infecção, portanto, houve declínio no número de casos devido a estratégias internacionais de mitigação, como o Plano de Eliminação que propõe os seguintes pontos: (1) diagnóstico precoce e tratamento completo, (2) manejo de vetores como pulverização residual intradomiciliar, (3) comunicação para impacto comportamental, (4) monitoramento, (5) avaliação com orientação e (6) gerenciamento de programas (OMS, 2021; BRASIL, 2022). A migração forçada induzida por conflitos e alterações climáticas recorrentes são fatores que facilitam a proliferação do vetor e transmissão da enfermidade, em consequência, percebe-se uma periodicidade de aumento de casos que ocorre de maneira cíclica no continente africano. Por isso, a meta de erradicação a partir do plano de eliminação da LVH foi alterada de 2021 para 2030. (MBChB *et al.*, 2018; SALEM *et al.*, 2016; ALVAR *et al.*, 2021; CASULLI, 2021).

Figura 1 - Estado de endemicidade da Leishmaniose Visceral Humana em todo o mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2021, tradução própria)

Ademais, em 2019, 14.505 casos foram reportados à Organização Mundial de Saúde (OMS), enquanto em 2021, 11.713. Esta redução está associada ao

período pandêmico em decorrência da Covid-19, cujo distanciamento social obrigatório resultou em baixa procura por serviços de saúde, afastando pacientes de profissionais da área da saúde (OMS, 2023). Com a sobrecarga do sistema de saúde, em decorrência da elevada incidência de Sars-CoV-2, a LVH deixou de ser prioridade de tratamento, o que interferiu negativamente no plano de eliminação da LVH e retardou sua aplicação no subcontinente da Índia e em outros países. A infecção por Sars-CoV-2 também levou a casos de coinfeção com LVH em que houve manifestações em quadro de assintomáticos e, em alguns casos, a morte desses pacientes (PAUL; SINGH, 2022). Estima-se que 500 mil casos de LVH e 50 mil óbitos sejam relatados anualmente, dentre os quais 25% - 45% não são reportados à OMS (SCARPINI *et al.*, 2022; OMS, 2023).

Na América Latina, 12 países encontram-se em estado de endemicidade, dentre eles, a Argentina, Colômbia, Venezuela, Paraguai e Brasil. Entre 2001 e 2017, a média de casos chegou a 3.516 por ano, em que 96% foram diagnosticados no Brasil. Majoritariamente, esses casos estão associados ao aumento da pobreza e baixo índice de recursos direcionados à saúde, além da subnotificação (OPAS, 2019; OMS, 2019).

No Brasil, a taxa de letalidade da LVH é de 95% e os fatores socioeconômicos que contribuem para o risco envolvem condições de moradia e higiene, acesso à educação e convivência com animais peridomésticos. Variáveis paisagísticas, ambientais e climáticas também estão relacionadas a este dado. (BRASIL, 2022; VALERO *et al.*, 2020). No país, a doença cursa com picos e diminuição de casos ao longo dos anos entre 1980 e 2021, porém, com alto índice de letalidade em 2021 (10,5%) quando em 2012 era de 7,6% (BRASIL, 2022). O Nordeste é a região mais afetada (GONTIJO *et al.*, 2004). Em relação ao estado de Pernambuco, 76 municípios já notificaram casos, sendo a maior parte na capital. No período entre 2009 a 2019, foram relatados 1.340 casos, destes, Recife confirmou 30,82%, enquanto as cidades Petrolina e Salgueiro, 14,1% e 10,74%, respectivamente (SILVA *et al.*, 2021).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

As fêmeas de insetos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) são os hospedeiros invertebrados responsáveis pela

transmissão da *Leishmania spp.* Em relação a América Latina e Central, o principal vetor da leishmaniose visceral é a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Figura 2), cuja cavidade oral produz saliva com propriedades vasodilatadoras e anticoagulantes que facilitam o acesso do agente etiológico à corrente sanguínea do hospedeiro (SASIDHARAN *et al.*, 2021; FILEMON *et al.*, 2012).

Figura 2 - Adulta fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*



Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2020.

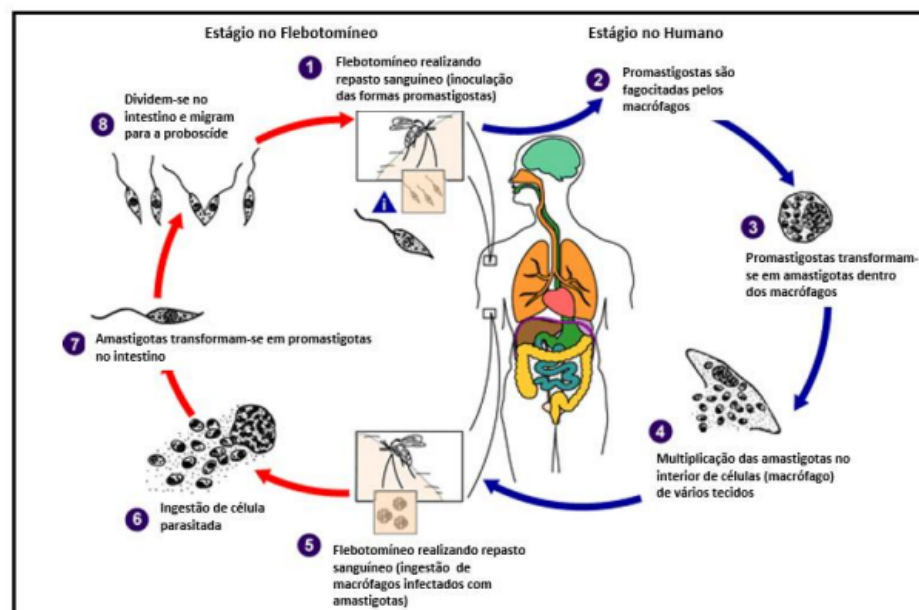
O gênero *Leishmania* pertence à família *Trypanosomatidae*, constituído por protozoários unicelulares, cuja reprodução ocorre por divisão binária simples e que possuem ciclo de vida digenético ou heteroxeno, pois ocorre tanto em mamíferos quanto em insetos (Figura 3). Os hospedeiros vertebrados de *Leishmania spp* provenientes da classe Mammalia compreende os roedores, cães, primatas, marsupiais, xenartros, procionídeos e ungulígrados primitivos, inclusive, os seres humanos (BASTOS *et al.*, 2015).

A infecção inicia-se no repasto sanguíneo, em que os insetos fêmeas inoculam promastigotas metacíclicas no tecido do hospedeiro. A partir disso, as promastigotas transpassam a camada de células dendríticas e fibroblastos parasitando os macrófagos e neutrófilos no sangue dos vertebrados. Assim, ao se ligarem à membrana do macrófago, as formas promastigotas são fagocitadas e envoltas pelo vacúolo parasitóforo, onde diferenciam-se em amastigotas e dividem-se sucessivamente até ocuparem grande parte do citoplasma da célula, resultando na lise da membrana celular. Dessa forma, as amastigotas disseminam-se por meio do

sangue e linfa para vários tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (AGUIAR; RODRIGUES, 2017; LIU; UZONNA, 2012).

Em um novo repasto sanguíneo, quando ingeridas pelo inseto vetor, as amastigotas são conduzidas para a porção anterior do trato digestivo do flebotomíneo e formam aglomerados chamados ilhas de amastigotas, se alojando na matriz peritrófica do vetor, onde diferenciam-se em promastigotas procíclicos. A matriz peritrófica se rompe e as formas migram para o epitélio do trato gastrointestinal (TGI) e multiplicam-se binariamente, aderindo-se ao epitélio por meio do flagelo (REY, 2001). Após a divisão, migram para a válvula estomodeal e passam pela metaciclogênese, ou seja, diferenciação em promastigotas metacíclicos, cujo flagelo adquire um tamanho maior, tornando-os mais ágeis e infectantes. Com o rompimento da válvula, os promastigotas metacíclicos chegam à probóscide e são regurgitados quando realizada a hematofagia (SASIDHARAN *et al.*, 2021).

Figura 3 - Ciclo biológico da leishmaniose visceral humana



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2013 (traduzido por BARBOSA, 2016)

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção pode se manifestar na fase aguda, cujos casos sintomáticos são caracterizados pela presença de febre irregular de longa duração,

hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia e perda de peso, que evolui e contribui para o óbito (Figura 4). Em países endêmicos, 60% da população apresenta anticorpos contra a *Leishmania*, sendo a maioria assintomáticos (SRIVASTAVA *et al.*, 2013; WILHELM, 2019). Após o estabelecimento da infecção, é possível observar o acometimento do fígado, medula óssea, linfonodos e outros tecidos em decorrência da resposta inflamatória desencadeada pelo sistema mononuclear fagocitário, em que a proliferação da forma amastigota resiste em vesículas fagolisossomais de macrófagos e em células dendríticas que migram para locais longe da picada. Ademais, são essas células que medeiam a resposta imunológica contra o parasito e pacientes que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) têm o agravamento da doença devido ao desenvolvimento de formas clínicas atípicas, com comprometimento dos sistemas respiratório e digestivo (LIU; UZONNA, 2012; FERREIRA *et al.*, 2022).

Figura 4 - Criança com hepatoesplenomegalia decorrente da LVH



Fonte: COSTA, 2014

Na forma crônica, a infiltração de plasmócitos, macrófagos, linfócitos e parasitas torna-se acentuada em diversos órgãos, como pulmões, rins, regiões do jejuno e íleo, com destaque ao baço, cuja característica típica de cronicidade apresentada são as áreas de infarto e o seu volume aumentado. No fígado, ocorre hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer e, no tecido hematopoiético, há

diminuição da produção celular, assim como hemofagocitose, principal aspecto que justifica a anemia instalada após a infecção (GOTO *et al.*, 2017).

2.4 TRATAMENTO

No Brasil, após o diagnóstico ser confirmado, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes que contém em sua formulação o antimoniato N-metil glucamina, que são distribuídas pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 mL, cuja concentração é de 81 mg de Sb^{+5} por mL. Para o tratamento da forma visceral, recomendam-se doses de 20 mg de Sb^{+5} kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, não ultrapassando o período de 20 a 40 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Por serem arritmogênicos e potencialmente tóxicos, tais medicamentos podem ser substituídos por drogas alternativas, como anfotericina B (desoxicolato sódico) e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e imunomoduladores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Desse modo, a anfotericina B lipossomal (AmB) é recomendada para pacientes com comorbidades, além de indivíduos com coinfeção *Leishmania*-vírus da imunodeficiência humana (HIV), gestantes, crianças e idosos (DOUTORA *et al.*, 2020). Seu mecanismo envolve a interação da porção micosamina da droga com o ergosterol presente na membrana do parasito, dificultando a manutenção da integridade estrutural, devido ao estresse oxidativo, resultando em morte celular (BANSAL *et al.*, 2019).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico deve ser realizado no início da infecção para que o paciente tenha maior chance de recuperação e diminuição de óbitos por LVH a partir do manejo terapêutico adequado. Para isso, há diversos métodos para detectar a infecção: a escolha por técnicas invasivas, como a biópsia para cultura, ou menos invasivas, como as técnicas imunológicas que cursam com a detecção de antígenos e anticorpos, além das moleculares, as quais detectam o DNA do parasito (FARIAS *et al.*, 2020).

Os casos assintomáticos podem ser diagnosticados a partir de uma abordagem epidemiológica, com a identificação de áreas onde o vetor e o parasito coexistem. Em adição, nesses casos, a sintomatologia pode surgir quando há desnutrição ou supressão imunológica, seja por uso de imunossupressores pós transplante, ou coinfeção com HIV (BARBOSA JÚNIOR, 2016). Com isso, cada caso diagnosticado e tratado resulta na diminuição da circulação da doença nas áreas endêmicas. (VIEIRA *et al.*, 2021; ALVES; BEVILACQUA, 2004).

2.5.1 Exames parasitológicos

Os primeiros casos no Brasil foram diagnosticados pelo exame direto de cortes histológicos confeccionados a partir da biópsia hepática de pacientes que morreram com suspeita da febre amarela (MAYER, 1935). A partir disso, o diagnóstico parasitológico tem sido utilizado e é considerado o padrão ouro para a leishmaniose visceral humana, devido a sua elevada especificidade por usar a microscopia (VIEIRA *et al.*, 2021; HERWALDT, 1999), ainda que a sensibilidade seja diminuída pela falta de uniformidade da carga parasitária em um mesmo tecido, principalmente em pacientes HIV, além de apresentar como limitação o desconforto para o paciente e, muitas vezes, falta de profissionais treinados nas unidades básicas de saúde (SOUZA *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2019).

O exame parasitológico direto, que é o padrão ouro, consiste na visualização das formas amastigotas em material biológico, como a medula óssea, linfonodo e baço. Dentre esses, o aspirado esplênico denota maior sensibilidade (93-97,8%) (FONSECA *et al.*, 2013), contudo, devido aos riscos e dificuldades em obter a amostra de aspirado esplênico, é recomendada a punção aspirativa da medula óssea (SOUZA *et al.*, 2013). Após a punção, uma gota do fluido é colocada sobre a lâmina e então é realizado o esfregaço, que deve ser fixado em álcool e corado com Giemsa, Wright ou Leishman (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Entretanto, uma desvantagem da técnica é o risco de hemorragias e a dor para o paciente (FONSECA *et al.*, 2013). Para que a observação no microscópio óptico seja considerada negativa para LVH, deve-se ler 200 campos por lâmina de 6 a 8 repetições (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As amastigotas encontradas também podem ser cultivadas a partir de uma gota do material de aspirado diluído em 0,5 mL de solução salina (PBS ou NaCl a

0,9%). A inoculação de 0,1 mL dessa solução em meios de cultivo líquidos, como Novy-McNeal-Nicolle (NNN), Liver Infusion Tryptose (LIT) ou de Schneider, faz com que as formas amastigotas assumam a forma evolutiva de promastigotas por conterem ágar e sangue de coelho. Os tubos com o meio inclinado devem ser direcionados para identificação da espécie. A amostra deve ser verificada semanalmente durante um mês. Apesar de ser altamente específico, o diagnóstico por cultura pode ser suscetível à contaminação microbiológica (Ministério da Saúde, 2006; MAIA, 2008).

2.5.2 Diagnóstico imunológico

Além do parasitismo tecidual, que ocorre durante a infecção por *Leishmania*, há o desenvolvimento da resposta imunológica do hospedeiro, com o estímulo da produção de linfócitos B para produzirem anticorpos. Com base nisso, os testes sorológicos podem ser aplicados para detectar a infecção por *Leishmania* (BARBOSA JÚNIOR, 2016). Os antígenos brutos, por não passarem pela purificação, conferem limitações, como a reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos de outras doenças, como a leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas, além de resultar em reações cruzadas contra malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (GONTIJO; MELO, 2004). Apesar disso, há vantagens como a fácil aplicabilidade, pois por serem menos invasivas, essas técnicas são mais aceitas por pacientes e médicos. Existem diferentes testes imunológicos, são eles: RIFI, DAT, testes imunocromatográficos e o ELISA (BARBOSA JÚNIOR, 2016).

As amostras utilizadas para detecção de anticorpos podem ser soro, plasma ou sangue total. Em contrapartida, o elevado custo do antígeno e longo período de incubação dificultam a aplicação dos testes imunológicos, além de não serem úteis para acompanhar a efetividade do tratamento, já que anticorpos presentes nas amostras dos pacientes podem se manter positivos e são detectados pelos testes durante muito tempo, mesmo após a recuperação. Outra problematização refere-se à coinfeção com HIV, pois, nesses casos, há imunossupressão agravada com redução dos títulos dos anticorpos (AKHOUND, 2010; SAVOIA, 2015).

Para o imunodiagnóstico de LVH, no Brasil, os testes mais empregados no diagnóstico são a RIFI e o ELISA, sendo o último o mais sensível (GONTIJO; MELO, 2004; FARIAS, 2020). ELISA é uma técnica rápida, de interpretação simples e opera com diferentes moléculas antigênicas, como histonas, proteínas nucleares, ribossômicas, e antígenos de superfície e, por isso, é útil para o diagnóstico da LVH (FARIAS, 2020). Para a LVH, a obtenção do antígeno dá-se por desativação das promastigotas dispostas em solução salina fosfatada por meio de congelamento gradual. Quando descongelada, a suspensão é submetida à centrifugação de 10.000 a 20.000 $\times g$ e o sobrenadante é utilizado para revestir os poços das placas de ELISA (KUMAR *et al.*, 2020). Podem ser utilizados antígenos derivados de parasitas intactos, moléculas solúveis ou promastigotas cultivadas, e a ligação antígeno-anticorpo é marcada por cromógeno, que altera a coloração quando há reação entre a enzima e o substrato (GONTIJO; MELO, 2004; BARBOSA JÚNIOR, 2016).

Por necessitar de mão de obra especializada, a RIFI, que é uma técnica de sensibilidade limitada, fica restrita aos hospitais de referência, além de não apresentar os requisitos necessários para ser aplicada em estudos epidemiológicos em larga escala, por ser uma técnica onerosa e de execução demorada. Em adição, necessita de microscópio de fluorescência para interpretação dos resultados a partir da emissão de um comprimento de onda por fluoróforos excitados, quando o conjugado fluorescente está ligado ao anticorpo humano anti-*Leishmania*, o que pode ser interpretado como um resultado positivo (GONTIJO; MELO, 2004).

O DAT é um teste sensível e semi-quantitativo para LVH, aceito em vários países endêmicos, cuja técnica consiste em identificar a presença de anticorpos a partir de antígenos liofilizados que, majoritariamente, são a tripsina tratada, e promastigotas mortas preservadas em formalina, coradas com azul brilhante. Esses antígenos são diluídos em frações e misturados à amostra do paciente, cuja diluição pode ser realizada adicionando 0,8% de 0,1 M β -mercaptoetanol. Após 18 horas de incubação à temperatura de 18 °C a 22 °C, o resultado pode ser comparado aos controles positivos e negativos, e é considerado positivo para LVH quando apresenta titulação $\geq 1:3.200$ (KUMAR *et al.*, 2020; BARBOSA JÚNIOR, 2015).

Ademais, o teste imunocromatográfico rápido torna-se uma boa alternativa para o diagnóstico da LVH, apesar de apresentar sensibilidade limitada, cujo fundamento é o uso de proteína recombinante fixada em membrana de nitrocelulose,

como a rk39, com sequências de 39 aminoácidos, predominante em amastigotas teciduais de *L. donovani*, e apresenta alta acurácia em países europeus e asiáticos. Entretanto, o teste pode positivar em casos de leishmaniose cutânea, mucosa e em indivíduos parasitados pelo *Trypanosoma cruzi* devido às reações cruzadas, as quais limitam a especificidade da técnica (BURNS *et al.*, 1993).

Para acompanhamento do prognóstico e terapêutica, o teste rápido KAtex elencou-se como ótima alternativa, pois representou um método sensível e específico baseado na aglutinação de partículas de látex que possuem anticorpos em sua superfície e ligam-se às glicoproteínas de *Leishmania*, quando estas são filtradas pelos rins de pacientes acometidos por LVH (BARBOSA JÚNIOR, 2016; SARKARI *et al.*, 2002).

2.5.3 Diagnóstico molecular

A biologia molecular proporcionou diversos avanços tanto para a pesquisa e inquéritos epidemiológicos quanto para o diagnóstico laboratorial. A partir da amplificação de ácidos nucleicos, a detecção e identificação de parasitas do gênero *Leishmania* é realizada com especificidade e sensibilidade elevadas, sem a necessidade de isolamento em cultura (GONTIJO; MELO, 2004). Métodos moleculares utilizados para LVH incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e algumas de suas variações, como o PCR quantitativo (qPCR), a Nested-PCR, PCR multiplex e a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) (DE RUITER *et al.*, 2014).

A PCR convencional é um teste qualitativo que identifica o genoma do parasito e o amplifica a partir de uma pequena quantidade de DNA circulante. Variações em sua execução surgem ao modificar a estratégia para investigação da sequência-alvo, como a PCR quantitativa (qPCR) e a Nested-PCR, sendo esta realizada em duas etapas de amplificação (DE RUITER *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2013). De um modo geral, a PCR baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA podendo ter como alvo o cinetoplasto (kDNA) da amastigota, a partir de amostras variadas, como sangue periférico, medula óssea, soro, urina, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos (BARBOSA JÚNIOR, 2016). Em comparação, o sangue periférico demonstrou uma sensibilidade de 92,1%, bem próxima a

sensibilidade para a medula óssea, 92,9%, evidenciando que para esse teste há possibilidades de obtenção de amostras menos invasivas e mais seguras (DEBORGGRAEVE *et al.*, 2008; RUITER *et al.*, 2014). Alguns materiais biológicos estão sendo investigados para o diagnóstico de LVH, visando melhorar a adesão dos pacientes à coleta, como Vaish *et al.* (2011) designaram o uso de swabs bucais como método não invasivo promissor, visto que são de fácil obtenção e manuseio. Ao selecionar *primers* específicos na PCR, é possível excluir microorganismos da mucosa bucal e direcionar a detecção de fragmentos de nucleotídeos da *Leishmania* no epitélio bucal com especificidade de 86%. Este método também pode ser aplicado para pacientes com coinfeção de HIV (DAS *et al.*, 2014).

A Nested-PCR é uma variação da PCR convencional de alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de LVH, que ocorre por meio de duas reações consecutivas juntamente a dois conjuntos de *primers*. A fim de evitar resultados positivos falsos, é aconselhável a solubilização prévia e a fixação dos *primers* internos na tampa do tubo em que sucederão as reações (SILVA *et al.*, 2013). Além disso, outras modificações são estudadas para a melhoria da técnica e redução de contaminações cruzadas, elevando a sua precisão (DEEPCHANDI *et al.*, 2019).

Entretanto, a qPCR apresenta alta sensibilidade, detectando um parasita por mL, por meio de tecnologias como o sistema SYBR Green e TaqMan, responsáveis por detectar alvos gênicos com maior sensibilidade. Baseado em um intercalador dsDNA fluorescente, o SYBR é menos específico que a tecnologia TaqMan, pois pode amplificar dímeros de *primers*, sendo necessária uma etapa adicional para interpretação dos resultados baseada na temperatura de melting (PEREIRA *et al.*, 2014). Em contrapartida, TaqMan dispõe de sonda específica para o alvo demarcado pelos *primers* e realiza a quantificação direta de DNA amplificado por meio da intensidade do sinal emitido pelo corante fluorescente, durante a atividade da Taq polimerase (MORTARINO *et al.*, 2004).

Como método molecular, a qPCR revela ser uma alternativa às técnicas comumente empregadas, como a microscopia óptica, a sorologia e a cultura *in vitro*. Os genes alvos mais escolhidos para identificar as espécies *L. donovani* e *L. infantum* são o kDNA, o *Inner Transcribed Spacer 1* (ITS1). Ademais, a pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA), o gene K26, o qual codifica a proteína da família de moléculas da superfície do gênero *Leishmania*, e 18S rRNA, são regiões específicas também utilizadas como alvos moleculares (BARBOSA

JÚNIOR, 2016; HARALAMBOUS *et al.*, 2008). Cada célula parasitária contém 36 moléculas de kDNA e, assim, ao isolar a molécula kDNA, a qPCR consegue identificar e quantificar cargas parasitárias baixas e imperceptíveis às outras técnicas (CASTELLI *et al.*, 2014; ABDELHALEEM, 2021). Com isso, a amplificação do alvo kDNA oferece maior sensibilidade (90,7%) quando comparada ao alvo ribossomal rDNA (70,1%) (BESHBISHY *et al.*, 2013).

Apesar de sua eficácia, qPCR tem limitações quanto a avaliação de recidiva da doença, cujos reagentes e instrumentos necessários exigem custos elevados. Por isso, houve o aprimoramento das técnicas moleculares, resultando na amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), que pode ser aplicado com alta especificidade e sensibilidade em locais com pouco recursos, pois não requer reagentes especiais ou equipamentos. Além disso, as etapas são simplificadas, garantindo maior velocidade (DIXITT *et al.*, 2018; Eiken Chemical Co., Ltd.). Na reação de LAMP, a uma temperatura fixa de aproximadamente 65 °C, seis regiões do gene alvo são reconhecidas simultaneamente por iniciadores internos e externos. O gene alvo pode ser detectado em uma etapa, por meio de um mix de *primers*, e *Bst* DNA polimerase, garantindo alta eficiência de amplificação (10^9 - 10^{10}) em até 60 minutos (NOTOMI *et al.*, 2015;).

A qPCR Multiplex torna possível o uso de painéis de *primers* que otimizam tempo e recursos para o processamento, pois permite a quantificação de múltiplos agentes infecciosos em uma mesma reação, mesmo com volumes mínimos de amostra e com alta sensibilidade. Assim, com o uso de alvos específicos, podem ser detectados os genes citocromo b de humanos e o kDNA de *Leishmania* e, ainda, DNA de reservatórios como o cão (SALES *et al.*, 2020).

Apesar da variedade de alvos e amostras que podem ser empregadas, o uso de ferramentas moleculares traz benefícios por proporcionarem uma melhor acurácia diagnóstica (RUITER *et al.*, 2014). A partir disso, sabendo-se que o diagnóstico não tardio é imprescindível para um bom prognóstico da LVH, é relevante demonstrar quais são as principais ferramentas aplicadas, apresentar estudos envolvendo a descoberta de novos alvos moleculares, incluindo o desenvolvimento e otimização de novas técnicas para diagnóstico da infecção, direcionando o profissional da saúde a uma melhor conduta do paciente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as ferramentas para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral humana a partir de uma revisão narrativa da literatura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar artigos científicos publicados na literatura em banco de dados científicos;
- Comparar os principais métodos moleculares empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral humana;
- Discutir quais técnicas apresentam melhor sensibilidade e especificidade para uma possível aplicação na rotina diagnóstica.

4 METODOLOGIA

Para desenvolver os objetivos propostos, foi realizada a revisão narrativa da literatura, com o intuito de reunir as informações encontradas em estudos de diferentes autores, a respeito dos métodos de diagnóstico molecular para LVH. Foram incluídos na pesquisa estudos clínicos e experimentais, que descrevessem os métodos de diagnóstico molecular para LVH, publicados entre o período de 2018-2023, atualizando informações relacionadas ao diagnóstico molecular anteriormente publicadas, e que abordassem a infecção apenas em humanos. A partir da leitura do título e do resumo, foram excluídos artigos publicados antes de 2018, que elencassem os métodos de diagnóstico laboratorial da LVH em cães e os que descrevessem isoladamente as demais formas de leishmaniose (leishmaniose cutânea, mucocutânea e leishmaniose dérmica pós-calazar). Os artigos filtrados também passaram por busca manual em que as referências foram levadas em consideração caso estivessem de acordo com os objetivos. A pesquisa foi realizada nos seguintes bancos de dados científicos: PubMed (*National Library of Medicine*), SciElo (*ScientificElectronic Library Online*) e MEDLINE, cujo processo de seleção

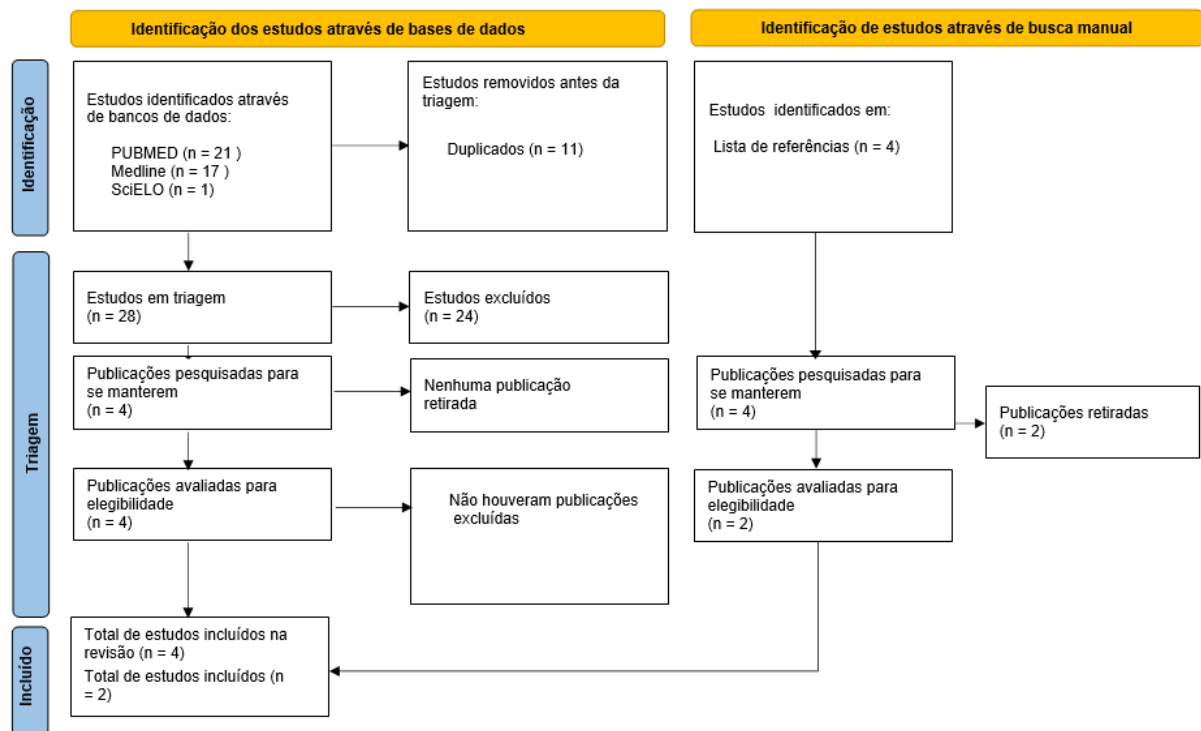
dos artigos ocorreu durante o período de março de 2023 a abril de 2023 e as chaves de busca foram: "*Leishmania*" AND "*Leishmania infantum*" AND "*human visceral leishmaniasis*" AND "*molecular diagnosis*" AND "*sensitivity*" AND "*specificity*".

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da busca nos bancos de dados, foram selecionados 39 artigos na pesquisa inicial: 21 no PubMed, 17 no MEDLINE e 1 no SciELO. Dentre esses, 11 artigos foram excluídos por serem duplicações. Os artigos restantes passaram por leitura de título e resumo, totalizando 28 artigos, dos quais 4 artigos foram selecionados e 24 foram removidos pois eram incompatíveis com o propósito do estudo sendo porque não abordaram métodos moleculares, não tinham especificidade e sensibilidade simultaneamente, não discorriam sobre a espécie humana, ou não estavam disponíveis gratuitamente. Portanto, a pesquisa resultou em 4 artigos que se enquadraram totalmente nos critérios de inclusão: IBARRA-MENESES *et al.*, 2021; RAHIM *et al.*, 2022; CHICHARRO *et al.*, 2023 e DE AVELAR; CARVALHO; RABELLO, 2019. Ao analisar os quatro artigos selecionados, outros foram incluídos a partir da seleção nas listas de referências dos artigos previamente selecionados. Foram estes: ADAMS *et al.*, 2018 e MUKHTAR *et al.*, 2018, totalizando 6 artigos (Figura 5).

Entre os artigos selecionados, quatro realizaram a análise molecular pesquisando o DNA da espécie *L. infantum* (Espanha, Brasil e Etiópia) e dois para *L. donovani* (Bangladesh e Sudão). A principal ferramenta molecular empregada nos trabalhos foi o LAMP, citada por quatro artigos, enquanto o restante utilizou a qPCR. O alvo mais explorado na literatura foi a região 18S ribossomal, componente da pequena subunidade ribossômica eucariótica, porém o kDNA também foi descrito pela literatura, além de SSU rRNA e K26. Cinco artigos utilizaram o sangue periférico como principal amostra biológica para a realização dos ensaios moleculares e, apenas um, a urina. A sensibilidade e especificidade encontradas nos artigos variaram de 92-100% e 96-100%, respectivamente (Tabela 1).

Figura 5 - Fluxograma da busca em banco de dados



Fonte: PRISMA, 2020.

A leishmaniose visceral humana é uma doença que apresenta evolução grave, cujo diagnóstico precoce torna-se de fundamental importância para redução da letalidade, pois assim podem ser aplicadas estratégias de profilaxia e tratamento adequado (BRASIL, 2022). Dessa forma, foram extraídos 39 artigos nas plataformas de busca e, ao final, foram selecionados seis artigos que atendiam aos critérios de inclusão para serem discutidos nesta revisão.

Os estudos aqui selecionados foram publicados entre 2018 e 2023 e abrangeram os países Brasil, Espanha, Bangladesh, Etiópia e Sudão. Existem diferenças clínicas relacionadas à distribuição geográfica dos grupos afetados, cujo mais afetado é o de adultos jovens que vivem no leste da África e Índia. Com período de incubação variável, os sintomas poderão se manifestar na LVH em 10 dias até um ano após a exposição. Os sintomas comuns, tanto o Novo Mundo (espécie *Leishmania infantum*) como o Velho Mundo (espécie *Leishmania donovani*) incluem febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza, que progridem ao longo de semanas a meses (PACE, 2014). Assim, a LVH é considerada um grave problema de saúde pública, sendo necessário o emprego de

métodos de diagnóstico que sejam confiáveis, rápidos e, também, que sejam de baixo custo para que a implementação do tratamento seja imediata (RUITER *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Trabalhos selecionados para a revisão narrativa da literatura.

Autores	País	Espécie	Alvo Molecular	Técnica	Amostra Biológica	Sensibilidade e Especificidade
IBARRA-MENESES <i>et al.</i> , 2021	Espanha	<i>L. infantum</i>	SSU rRNA ⁽¹⁾ , kDNA ⁽²⁾	LAMP ⁽⁶⁾	Sangue periférico	97,7 % e 96%
RAHIM <i>et al.</i> , 2022	Bangladesh	<i>L. donovani</i>	kDNA	qPCR ⁽⁷⁾	Urina	100% e 100%
DE AVELAR; CARVALHO; RABELLO, 2019	Brasil	<i>L. infantum</i>	K26 ⁽³⁾ e kDNA	LAMP	Sangue periférico	K26: 98,20/98,10% kDNA: 100/100%
CHICHARRO <i>et al.</i> , 2023	Espanha	<i>L. infantum</i>	18S rRNA ⁽⁴⁾	Leish-qPCR ⁽⁸⁾	Sangue periférico	98% e 98%
ADAMS <i>et al.</i> , 2018	Etiópia	<i>L. infantum</i>	18S (rDNA) ⁽⁵⁾	LAMP	Sangue periférico	92% e 100%
MUKHTAR <i>et al.</i> , 2018	Sudão	<i>L. donovani</i>	18S rRNA	LAMP	Sangue periférico	97,65% e 99,01%

⁽¹⁾SSU rRNA, ácido ribonucleico ribossômico de subunidade pequena; ⁽²⁾kDNA, DNA do cinetoplasto; ⁽³⁾K26, gene codificante da proteína B de superfície de *L. infantum*; ⁽⁴⁾18S rRNA, RNA ribossômico 18S; ⁽⁵⁾18S (rDNA), pequena subunidade 18S do DNA ribossômico; ⁽⁶⁾LAMP, Amplificação Isotérmica Mediada por Loop; ⁽⁷⁾qPCR, PCR quantitativa; ⁽⁸⁾Leish-qPCR, PCR quantitativa duplex.

Ibarra-Menezes *et al.* (2021) realizaram uma avaliação do LAMP a fim de verificar a importância da adoção desta técnica no monitoramento da eficácia do tratamento em ensaios clínicos, sendo destacada como vantajosa por seu reduzido tempo de análise e simplicidade da técnica, com 97,7% de sensibilidade e 96% de especificidade, respectivamente, como exposto na tabela 1. Assim, a literatura destaca que são necessários novos estudos que objetivem alcançar os melhores

parâmetros de sensibilidade e especificidade para testes de diagnóstico na LVH, que respeitem os seguintes critérios: $\geq 95\%$ de sensibilidade, $\geq 98\%$ de especificidade e, principalmente, que apresentem um menor tempo de execução, com ≤ 30 min (BOELAERT *et al.*, 2007). Desse modo, o tratamento seria realizado mais rapidamente, reduzindo a letalidade na LVH.

No estudo de Rahim *et al.* (2022), o ensaio de PCR em tempo real foi capaz de detectar 0,1 parasita por reação empregando amostras de urina. Em seu trabalho, é destacado que o diagnóstico molecular na urina apresentou 100% de sensibilidade, comparável a sensibilidade apresentada por outras amostras biológicas comumente empregadas para o diagnóstico da LVH, como o sangue total e medula óssea. Entretanto, Bezerra *et al.*, (2019) reforçam que a urina é uma amostra biológica promissora, mas que ainda não é amplamente utilizada devido a várias questões, tais como a incompreensão de todo o processo fisiopatológico renal na leishmaniose visceral, presença de muitos inibidores de amplificação na urina, além da necessidade de um método eficiente de extração de DNA urinário. Em contrapartida, o estudo de Rahim *et al.* (2022) aqui selecionado pode estimular futuros trabalhos para a seleção dessa amostra biológica em ensaios de qPCR, substituindo, futuramente, amostras de sangue ou as mais invasivas, como medula óssea ou baço. Em adição, Vaish *et al.* (2011) relatam a coleta da mucosa bucal com uso de swabs como mais uma opção promissora de matriz biológica pois é ainda menos invasiva e de fácil obtenção.

Enquanto isso, De Avelar; Carvalho; Rabello (2019) investigaram um alvo molecular alternativo para o kDNA, que já é muito difundido para a rotina diagnóstica. O alvo K26, utilizado em estudos de caracterização molecular das espécies do complexo *L. donovani* (CHICHARRO *et al.*, 2013; HARALAMBOUS *et al.*, 2008), apresentou uma sensibilidade de 98,2% e especificidade de 98,1%, em relação ao kDNA, que, para o mesmo estudo, resultou em sensibilidade de 100% e especificidade 100%, porém, sem diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$). Com isso, a procura por novos alvos moleculares são reiterados na literatura, para que seja possível localizar ferramentas moleculares de maior sensibilidade e especificidade (NICOLAS *et al.*, 2002). Assim, o LAMP surge como uma ferramenta promissora para avaliar novos alvos moleculares a serem incorporados no diagnóstico da LVH.

Já Chicharro *et al.* (2023), destacam que a Leish-qPCR apresentou um

excelente desempenho no diagnóstico da LVH, com sensibilidade e especificidade de 98%. Em adição, os autores recomendam ensaios de qPCR devido ao mínimo de manuseamento de reagentes e, por conseguinte, a probabilidade de contaminação é também menor. Ademais, reitera que o alvo 18S rRNA pode ser introduzido no algoritmo de diagnóstico da LVH com abordagem epidemiológica. Vieira et al. (2021) sugerem a utilização da técnica qPCR em novos alvos, principalmente com a pesquisa por sequências de RNA em material biológico, que é útil para o diagnóstico de LV assintomática em humanos, assim, é possível quantificar a carga parasitária e avaliar a viabilidade do parasita. Com isso, o mínimo manuseio de reagentes, por utilizar master mix e eliminar a etapa da eletroforese, e a escolha por alvos sensíveis e específicos, torna a qPCR uma ferramenta promissora para o diagnóstico da LVH.

Adams et al. (2018) destacam que o LAMP poderia ser utilizado potencialmente para confirmar a infecção por *Leishmania*, pois apresentou boa sensibilidade e especificidade (92% e 100%, respectivamente), podendo ser empregado em áreas onde não é possível coletar amostras de biópsia devido à falta de instalações médicas adequadas. Também reiteram que o LAMP pode ser empregado para confirmar a infecção e propõem, como alternativa, que o exame direto seja realizado apenas em casos de indivíduos LAMP negativos, mas que ainda permanecem suspeitos de LVH. Notomi et al. (2015) destacam que a execução do LAMP é simples e não requer equipamentos caros; portanto, pode ser usado em instalações laboratoriais básicas, desde que haja condições mínimas para a realização da extração de DNA, utilizando um banho maria em condição isotérmica para a execução do ensaio. Desse modo, a técnica precisa ser adaptada para a condição de campo, uma vez que ainda é necessária uma etapa anterior de extração do material genético, que necessita de instalações elétricas para o funcionamento dos equipamentos.

Mukhtar et al., (2018) propõem um kit diagnóstico baseado em LAMP (Loopamp *Leishmania* Kit), apresentando um bom desempenho (97,65% de sensibilidade e 99,01% de especificidade), podendo este ser incluído no algoritmo para diagnóstico de LVH, substituindo a necessidade de aspiração invasiva de linfonodos, fato este que reforça a proposta de Adams et al., (2018). Ademais, pode-se destacar que Ibarra-Meneses et al., (2021); De Avelar; Carvalho; Rabello (2019) e Adams et al. (2018) utilizaram alvos relacionados à subunidade menor

ribossomal de *Leishmania*, provando ser uma região bastante promissora para o diagnóstico em amostras extraídas de sangue periférico de indivíduos com LVH; no entanto, não foi possível encontrar uma uniformidade quando considerada a sensibilidade e especificidade entre todas as técnicas, sendo a urina, a única amostra biológica que apresentou 100% de sensibilidade e especificidade; no entanto, apenas em ensaios de qPCR.

6 CONCLUSÃO

- O diagnóstico molecular baseado em LAMP foi o mais empregado para o diagnosticar a LVH, por ser mais rápido e de simples execução, apresentando boa sensibilidade e especificidade;
- O alvo mais utilizado para o diagnóstico da LVH foi o relacionado à subunidade menor ribossomal;
- A utilização do LAMP na rotina precisa ser adaptado para a condição de campo, uma vez que ainda é necessária uma etapa prévia de extração do material genético, que necessita de instalações elétricas para o funcionamento dos equipamentos.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALEEM, Aymen. et al. Diagnosis and causative species of visceral leishmaniasis in southwest Saudi Arabia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 105, n. 3, p. 654–659, 2021.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 19, n.1 - jun. 2017.
- AL-SALEM, Waleed.; HERRICKS, R. Jennifer; HOTEZ, . J. Peter. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites & vectors**, Londres v. 9, n. 1, 2016.
- ALVES, Waneska. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- BANSAL, Ruby. et al. Stigmasterol as a potential biomarker for amphotericin B resistance in *Leishmania donovani*. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, Londres, v. 75, n. 4, p. 942–950, 2020.
- BARBOSA JÚNIOR, L. Walter. et al. Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 93, n. 5, p. 967–969, 2015.
- BARBOSA JÚNIOR, L. Walter. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde. Disponível em: <https://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2016barbosa-BARBOSA_JÚNIOR-wl.pdf>. Acesso em: 19 apr. 2023.

BASTOS, Thiago. et al. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral. **Enciclopédia Biosfera**, Jandaia, v. 11, n. 22, 2015.

BEZERRA, Gilberto. S. N. et al. Urine as a promising sample for Leishmania DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis - a review. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 111–120, 2019.

BOELAERT, Marleen. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature reviews. Microbiology*, Londres, v. 5, n. S11, p. S31–S39, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerale.pdf> Acesso em: 17 mar. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2014. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerale_1edicao.pdf> . Acesso em: 19 apr. 2023.

BURNS, J. M., Jr. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

BURZA, Sakib et al. Leishmaniasis. **Lancet**, New York, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CASULLI, Adriano. New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021-2030. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 15, n. 5, p. e0009373, 2021.

CHICHARRO, Carmen. et al. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **Euro Surveill**, Saint-Maurice, 25 jul. 2013.

CHICHARRO, Carmen. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in Spain: Development and validation of ready-to-use gel-form nested and real-time PCRs to detect *Leishmania* spp. **Microbiology spectrum**, Washington, p. e0335422, 2023.

COLOMBA, Claudia et al. Third case of visceral leishmaniasis in COVID-19: Mini review article. **Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 913, 2022.

COSTA, D.L; COSTA, C.H.N. Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., e ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, pp. 327-353, 2014.

DAS, Sushmita. et al. Specific noninvasive detection of *Leishmania donovani* in desquamated buccal cell swab samples from human visceral Leishmaniasis-HIV coinfecting patients. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1238–1241, 2014.

DE AVELAR, M. Daniel. ; CARVALHO, D. M.; RABELLO, A. Development and clinical evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Brazil. **BioMed research international**, Nova York, v. 2019, p. 8240784, 2019.

DE RUITER, Corinne. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 52, n. 9, p. 3147–3155, 2014.

DEBORGGRAEVE, Stijn. et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. **Tropical**

medicine & international health: TM & IH, Oxford, v. 13, n. 11, p. 1378–1383, 2008.

DEEPACHANDI, B. et al. A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, Londres v. 19, n. 1, p. 623, 2019.

DIXIT, Keerti. K. et al. Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 12, n. 11, p. e0006922, 2018.

ELSHAFIE, Amir et al. General false positive ELISA reactions in visceral leishmaniasis. Implications for the use of enzyme immunoassay analyses in tropical Africa. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 431, p. 66–71, 2016.

ERBER, A et al. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & vectors**, Londres, v. 15, n. 1, p. 34, 2022.

FARIAS, Roberto. C. et al. Estudo comparativo entre metodologias para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 71398–71409, 2020.

FERREIRA, Gabriel. R. et al. Biomarkers of disease severity in patients with visceral leishmaniasis co-infected with HIV. **Cytokine**, São Diego, v. 149, n. 155747, p. 155747, 2022.

FILEMON, Paulo. et al. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT - EM -2012. CAPÍTULO 12 A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores. Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_12_A_Interacao_do_Protozoario_Leishmania_com_seus_Insetos_Vetores.pdf>. Acesso em: 19 apr. 2023.

FREIRE, Mariana Lourenço et al. Evaluation of a new brand of immunochromatographic test for visceral leishmaniasis in Brazil made available from 2018. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasília, v. 60, p.1-4, 13 set. 2018.

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

GONTIJO, M. F. Célia.; MELO, N. Maria. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia Brazilian journal of epidemiology**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GOTO, Yasuyuki. et al. Prevalence, severity, and pathogeneses of anemia in visceral leishmaniasis. **Parasitology research**, Berlim, v. 116, n. 2, p. 457–464, 2017.

GUTIÉRREZ-OCAMPO, Estefanía. et al. Human visceral leishmaniasis prevalence by different diagnostic methods in Latin America: a systematic review and meta-analysis. **Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, Salerno, v. 29, n. 2, p. 199–208, 2021.

HARALAMBOUS, Christos. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani*/*Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, New York, v: [s.n.]. v. 60, 2008.

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**, Basileia, v. 9, n. 3, p. 610, 16 mar. 2021.

KUMAR, Awanis. PANDEY, S. Chandra.; SAMANT, Mukesh. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. **Parasite immunology**, Oxford, v. 42, n. 10, p. e12727, 2020.

LIU, Dong.; UZONNA, Jude. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Madri, v. 2, p. 83, 2012.

LSH Ab ECO Teste. Disponível em: <<https://ecodiagnostica.com.br/diagnostico-rapido/lsh-ab-eco-teste/>>. Acesso em: 21 may. 2023.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008.

MAYER, M. Viszerale Leishmaniose in Brasilien. Nach Befunden von HA Penna. Archiv fur Schiffs- und Tropenhygiene 1935 Vol.39 No.3 pp.128-129. Disponível em: <www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19352900950>. Acesso em: 3 Apr. 2023.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1–2, p. 163–167, 2004.

NICOLAS, Luc. et al. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, n. 5, p. 1666–1669, 2002.

NOTOMI, Tsugunori. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of Microbiology**, Seul, v. 53, n. 1, p. 1–5, 2015.

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>> [s.l: s.n.].

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. PAHO, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>. Acesso em: 27, fev. 2023.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas, Washington: Organización Panamericana de la Salud, p.1-7 2020.

PACE, David. Leishmaniasis. **The Journal of infection**, Londres, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, 2014.

PAUL, Anindita.; SINGH, Sushma. Visceral leishmaniasis in the COVID-19 pandemic era. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 117, n. 2, p. 67–71, 2023.

PEREIRA, Mariana. R. et al. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. **BioMed research international**, Londres, v. 2014, p. 639310, 2014.

RAHIM, Samiur. et al. Real Time PCR-based diagnosis of human visceral leishmaniasis using urine samples. **PLOS global public health**, São Francisco, v. 2, n. 12, p. e0000834, 2022.

REY, Luís. O complexo “Leishmania donovani” e a Leishmaníase Visceral. In.: Parasitologia. parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SALES, K. G. DA S. et al. Fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of dog and human blood and Leishmania parasites in sand flies. **Parasites & vectors**, Londres, v. 13, n. 1, p. 131, 2020.

SARKARI, Bahador. et al. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **Acta Tropical**, Basileia, v. 82, p. 339–348, 2002.

SASIDHARAN, Santanu. SAUDAGAR, Prakash. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology research**, Berlim, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.

SAVOIA, Daniella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**, Sassari, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCARPINI, Sara. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, Basileia, v. 10, n. 10, 2022.

SILVA, S. Márcia M. View of Epidemiology of human visceral leishmaniasis in Petrolina, Pernambuco, from 2009 to 2020: a descriptive analysis. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21848/19503>>. Acesso em: 19 apr. 2023.

SILVA, Maria et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental parasitology**, Nova York v. 134, n. 2, p. 206–210, 2013.

SRIVASTAVA, Pankaj. et al. Molecular and serological markers of Leishmania donovani infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 548–554, 2013.

SUNDAR, Shyam; RAI, Mayank. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

VAISH, Manisha. et al. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2003–2005, 2011.

VALERO, Nadia. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology research**, Berlim, v. 119, n. 2, p. 365–384, 2020.

VIRGINIA BATISTA VIEIRA, Amanda. et al. Evaluation of molecular techniques to visceral leishmaniasis detection in asymptomatic patients: a systematic review. **Expert review of molecular diagnostics**, Londres, v. 21, n. 5, p. 493–504, 2021.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose; Visceral leishmaniasis. **Der Chirurg**, Berlim, v.39 No.3 pp.128-129, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on neglected tropical diseases 2023. Genève, Switzerland: World Health Organization, 2023.