

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

NAYORE TAMIE TAKAMIYA

**Ferramentas Moleculares Aplicadas ao Estudo de Parasitas Emergentes em
Leishmaniose Visceral**

**SÃO CARLOS -SP
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

NAYORE TAMIE TAKAMIYA

**Ferramentas Moleculares Aplicadas ao Estudo de Parasitas Emergentes em
Leishmaniose Visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Subárea: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Sandra Regina Costa Maruyama

SÃO CARLOS- SP

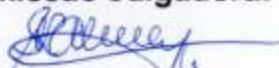
2023

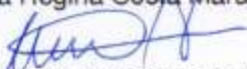


Folha de Aprovação

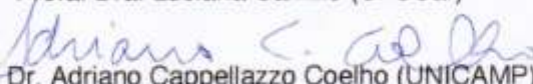
Defesa de Tese de Doutorado da candidata Nayore Tamie Takamiya, realizada em 27/09/2023.

Comissão Julgadora:


Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama (UFSCar)


Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)


Profa. Dra. Luciana Camillo (UFSCar)


Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (UNICAMP)

Prof. Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira (FIOCRUZ)



Documento assinado digitalmente

GABRIEL EDUARDO MELIM FERREIRA

Data: 03/10/2023 09:35:40-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo o apoio e amor incondicional, por acreditarem em minha capacidade de superar qualquer adversidade. À Dona Joanninha Francellin Sartarelli (*in memoriam*) pelo exemplo de força e de determinação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fideo Takamiya e Maria Lucia Sartarelli Takamiya e ao meu irmão Yuri Tadashi Takamiya por serem meus maiores incentivadores nessa jornada. Expresso minha sincera gratidão aos meus pais por toda a confiança depositada e pela compreensão das escolhas de vida que fiz. Sempre ofereceram uma rede apoio e amor em todos os momentos, especialmente nos desafiantes. Sou grata também pela base sólida familiar que me proporcionaram, pela oportunidade de educação e pelo exemplo que são como pessoas éticas e íntegras, por me guiarem a uma excelente formação pessoal enraizada em valores humanos.

Quero expressar minha gratidão aos amigos que fiz ao longo desta jornada. A vocês: Camila Rolemberg, Ellen Gomes, Talita Takahashi, Caio Oliveira, Thaiane Robeldo e Gustavo Toma pelos dias de alegria, pelas trocas de ideias, pelas conversas sinceras e pela partilha de sonhos entre um café e outro, suas companhias trouxeram leveza aos momentos difíceis. Agradecimento especial a Patrícia Passos e a Luana Rogério, que não foram apenas amigas, mas também proporcionaram um sentimento de família, junto à nossa pequena Alice. O carinho e o apoio emocional que me ofereceram fizeram possível percorrer esse caminho com mais serenidade e tranquilidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Maruyama, sou grata pela oportunidade concedida no laboratório e por integrar uma linha pesquisa promissora e desafiadora como a que desenvolvemos. Agradeço também pela confiança depositada em mim nesses anos de caminhada juntas. Suas orientações, discussões construtivas e conselhos foram fundamentais para minha formação e crescimento profissional e científico. Cada conversa e incentivo proporcionaram uma nova perspectiva e visão de senso crítico sobre o que é mundo científico e acadêmico.

Quero reconhecer e agradecer aos jovens iniciantes na carreira científica do Laboratório de Bioquímica Celular, Carolina Torres, Giovana Maffei e Wesley Klaysson pelas contribuições colaborativas no dia a dia, as trocas de ideias, companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, cuja solícita presença e generosidade ao compartilhar seu laboratório foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Também gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, Prof. Dr. Iran Malavazi, Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Prof. Dr. Ricardo Borra e a Profa. Dra. Lisandra Marques Gava Borges pela disponibilização dos equipamentos em seus respectivos laboratórios que foram essenciais para o estudo.

A todos os colaboradores direto desse projeto por tornar possível: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, Dra. Fabrícia Alvisi, Prof. Dr. João Santana da Silva, Prof. Dr. José Marcos Ribeiro, aos grupos de pesquisa da Profa. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, Profa. Dra. Tricia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, em especial seu aluno de

doutorado Ms. João Augusto Franco Leonel, Prof. Dr. Rodrigo Gurgel-Gonçalves, Profa. Dra. Ângela Cruz e Dra. Juliana Ferreira Bório. Aos colaboradores dos projetos de pesquisa executados em paralelo com os grupos de pesquisa do Prof. Andrey José de Andrade, Profa. Dra. Patrícia Quaresma e Profa. Dra. Tâmara Dias Oliveira Machado.

À Profa. Dra. Lucile Floeter-Winter e a coleção de cultura de tripanossomatídeos da Universidade de São Paulo (USP) por ceder gentilmente a cepa de *C. fasciculata* (TCC039E). E ao Dr. Rodrigo Mattos dos Santos pela gentileza de ceder a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* da Coleção de Culturas do Laboratório de Moléstias Infecciosas (UNIPEX) Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FMB, Botucatu, SP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão inicial de bolsa de Mestrado (Processo GM 133661/2020-2).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de recursos destinados ao desenvolvimento deste projeto por meio de bolsa de Doutorado Direto (Processo 2021/12464-8) e de auxílio à pesquisa na modalidade Jovem Pesquisador (Processo 2016/20258-0).

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e do Departamento de Genética Evolutiva pelo suporte acadêmico e de infraestrutura.

E por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta etapa fosse concluída, obrigada.

"A resiliência é a força que nos permite perseverar em meio aos desafios da ciência, onde o progresso muitas vezes é lento e os resultados incertos."

Angela Duckworth

RESUMO

As Leishmanioses são doenças negligenciadas consideradas um importante problema para a saúde pública. A Leishmaniose Visceral (LV) é forma mais grave da doença e acomete órgãos como baço, medula óssea, fígado e linfonodos. No Brasil, é causada pela espécie *Leishmania infantum*. Os avanços das ferramentas de Biologia Molecular fornecem alternativas em centros de referências de diagnóstico e de pesquisas. Estudos tem evidenciado a presença de tripanossomatídeos monoxênicos (*Leptomus spp.* e *Crithidia spp.*) no espectro clínico das Leishmanioses. A implicação clínica dessas espécies de tripanossomatídeos em Leishmanioses é desconhecida e o impacto dessas infecções pouco estudado. Neste contexto, são necessárias o aprofundamento de pesquisas para identificação e investigação de *Crithidia sp.* Desse modo, este trabalho apresentou dois objetivos para colaborar no avanço do conhecimento sobre parasitas emergentes em LV. Um deles foi validar novos genes espécie-específicos capazes de discriminar as espécies *L. infantum* e *Crithidia sp.* em amostras clínicas e experimentais. O outro objetivo foi obter linhagens geneticamente modificadas de parasitas expressando genes repórteres fluorescentes por meio de técnicas de engenharia genética e transfecção celular, sendo o gene da proteína verde (GFP) na cepa de *Crithidia sp* LVH60A (cepa LVH60a_C1) e mCherry na cepa HUUF14 de *L. infantum*. Os *primers* projetados para identificar *L. infantum* (LinJ31seq e LinJ31_2420) e *Crithidia sp* (Crid2.1seq, LVH60_Tig001 e Catalase-LVH60_12060_1F) demonstraram especificidade, com bom desempenho de detecção. Esses *primers* foram validados, tanto para a identificação qualitativa de espécie quanto para a estimar quantitativamente a carga parasitária em amostras experimentais e clínicas de LV, abrangendo uma variedade de hospedeiros vertebrados. Por meio da triagem molecular e de análise de 62 isolados clínicos de pacientes com LV utilizando esses genes espécie-específicos, foi possível identificar 51 culturas de parasitas com resultado positivo na PCR para *Crithidia sp.* De maneira interessante, ensaios de qPCR indicaram a coinfeção de *L. infantum* com *Crithidia sp.* LVH60A em dois novos casos de LV em Sergipe. Além disso, reavaliando amostras clínicas de um caso de LV também de Sergipe publicado em 2019, foi constatado que o paciente estava coinfectado com essas duas espécies de tripanossomatídeos. Com os experimentos de transfecção, foi possível transformar a cepa de HUUF14 (*L. infantum*) expressando o gene fluorescente mCherry apresentando característica fenotípica semelhante à linhagem selvagem com capacidade de infectividade em ensaios de infecção *in vitro*. Os protocolos de transfecção testados neste trabalho não foram eficientes para a transformação de *Crithidia sp* LVH60A, evidenciando as particularidades desse parasito. De forma geral, este estudo desempenhou importante papel no estabelecimento de novos alvos moleculares que podem ser empregados para aprimorar o diagnóstico da LV. Além disso, tais alvos também se mostram promissores

para investigações futuras, visando aprofundar nossa compreensão sobre o papel dos tripanossomatídeos monoxênicos na patologia da LV e/ou como potenciais parasitas emergentes.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; PCR em tempo real (qPCR); Leishmaniose Visceral; *Leishmania infantum*; *Crithidia* sp. LVH60A; coinfeção por tripanossomatídeos.

ABSTRACT

*Leishmaniases are neglected tropical diseases considered important to public health. Visceral Leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, which affects organs such as spleen, bone marrow, liver and lymph nodes. It is caused by Leishmania infantum in Brazil. Advances in Molecular Biology tools have provided alternatives for diagnostics at research reference centers. Studies have demonstrated the presence of monoxenous trypanosomatids (Leptomastix spp. and Crithidia spp.) in the clinical spectrum of Leishmaniasis. The clinical implications of these trypanosomatid species in Leishmaniasis are unknown, and the impact of these infections has rarely been studied. Further research is necessary to identify and investigate these species. Therefore, this work presented two goals to advance knowledge about this emerging VL parasites. The first one was to identify new species-specific genes able of discriminating between L. infantum and Crithidia sp. in clinical and experimental samples. The second one was to obtain genetically modified strains of parasites expressing fluorescent reporter genes through genetic engineering and cell transfection techniques, such as the green fluorescent protein (GFP) gene in Crithidia sp. LVH60A (strain LVH60a_C1) and mCherry in the HUUF14 strain of L. infantum. Primers designed to identify L. infantum (LinJ31seq and LinJ31_2420) and Crithidia sp. (Crid2.1seq, LVH60_Tig001, and Catalase-LVH60_12060_1F) showed a good performance of detection. These primers have been extensively validated, both for species identification (qualitatively) and for estimation of parasite load (quantitatively) in experimental and clinical VL samples, covering a variety of vertebrate hosts. Through molecular screening and analysis of 62 clinical isolates from VL patients using these species-specific genes, it was possible to identify 51 parasite cultures with positive PCR results for Crithidia sp. Interestingly, qPCR assays indicated co-infection of L. infantum with Crithidia sp. LVH60A in two new cases of VL in Sergipe. Furthermore, by re-evaluating clinical samples from a case of VL from Sergipe published in 2019, it was found that the patient was co-infected with these two species of trypanosomatids. With the cell transfection experiments, it was possible to transform the HUUF14 strain (L. infantum) expressing the fluorescent gene mCherry, presenting phenotypic characteristics similar to those of the wild-type strain and keeping infective capacity in *in vitro* infection assays. The transfection protocols tested in this study were inefficient for the transformation of Crithidia sp. LVH60A, highlighting the peculiarities of the parasite. Overall, this study was important in establishing new molecular targets that can be used to improve the diagnosis of VL. Furthermore, such targets show promise for future investigations, aiming to deepen our understanding of the role of monoxenic trypanosomatids in VL pathology and/or as potential emerging parasites.*

Keywords: *Molecular diagnosis, real-time PCR (qPCR), Visceral Leishmaniasis; Leishmania infantum, Crithidia sp. LVH60A: co-infection with trypanosomatid parasites.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Morfologia celular de <i>Leishmania</i> .	24
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	25
Figura 3: Endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.	26
Figura 4: Relações evolutivas entre tripanossomatídeos.	34
Figura 5: Fluxograma de trabalho evidenciando as etapas e atividades executadas durante a realização deste trabalho no que concerne a parte de detecção específica de parasitas.	40
Figura 6: Fluxograma das atividades executadas referente à transfecção de genes repórteres em cepas de <i>Crithidia</i> sp e <i>L. infantum</i> .	51
Figura 7: Mapa dos vetores pSSU_EGFP-C1/Neo e pSSU_mCherry-C1/ Neo.	52
Figura 8: Alinhamento de sequência da região alvo (98 pb) do <i>primer</i> LinJ31_2420 em parasitas <i>Leishmania</i> .	59
Figura 9: Curva de dissociação e gráfico de ampliações usando os <i>primers</i> LinJ31_2420 e LinJ31_L42486.1.	61
Figura 10: Alinhamento de sequência da região alvo (107 pb) do <i>primer</i> Catalase_LVH60-12060_1F em parasitas <i>Crithidia</i> .	63
Figura 11: Resultado do ensaio de qPCR com par de <i>primers</i> Catalase_LVH60-12060_1F.	64
Figura 12: Especificidade do <i>primer</i> Catalase_LVH60-12060_1F.	65
Figura 13: Curva padrão dos ensaios de qPCR construída com a massa de DNA de cada espécie de parasita (<i>L. infantum</i> e <i>Crithidia</i>) e os respectivos <i>primers</i> , Linj31_2420 ou Catalase_LVH60-12060_1F.	66
Figura 14: Coeficiente de variação (%) das curvas padrão qPCR intra e inter-ensaios.	68
Figura 15: Precisão dos ensaios qPCR na quantificação de parasitas avaliada através de um experimento de spike-in para cada <i>primer</i> .	70
Figura 16: Macrófagos THP-1 infectados com cepa HUUFS14 (<i>L. infantum</i>), LVH60a_C1, LVH117_C1 (<i>Crithidia</i> sp LVH60A) e TCC039E (<i>C. fasciculata</i>).	72
Figura 17: Quantificação de parasitas <i>L. infantum</i> e <i>Crithidia</i> em infecções <i>in vitro</i> de macrófagos derivados de THP-1.	73
Figura 18: Quantificação de <i>L. infantum</i> em órgãos de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos a infecções experimentais <i>in vivo</i> com isolados clínicos de <i>Leishmania</i> . Os isolados clínicos foram codificados como #1851, #1686, #1580 e #515.	74
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose (1%) de PCR convencional realizada com amostras de pacientes com LV do HUUFS.	76
Figura 20: Quantificação de parasitas <i>L. infantum</i> e <i>Crithidia</i> em amostras de pacientes com LV e animais domésticos por qPCR.	77

Figura 21: Árvore filogenética com sequências de rRNA TRY927/SSU561 detectadas em amostras de medula óssea e sangue periférico de cães com LV.	78
Figura 22: Gráfico de amplificação com primer LinJ31_2420 em amostras de flebotomíneos por qPCR.	79
Figura 23: Produto da PCR com primer pSSU-NEO dos genes repórteres.	80
Figura 24: Gráfico da curva de crescimento e do cálculo para determinação da DL50 de G418.	80
Figura 26: Cepa LVH60a_C1 (<i>Crithidia</i> sp LVH60A) transfectada expressando o gene repórter EGFP.	81
Figura 27: Gráfico da curva de crescimento da cepa HUUFS14_mCherry em comparação com cepa selvagem de HUUFS14 (<i>L. infantum</i>).	83
Figura 28: Infecção in vitro em THP-1 com cepa de <i>L. infantum</i> transfectada com o gene repórter mCherry.	83
Figura 29: Estimativa da carga parasitária por qPCR com <i>primer</i> LinJ31_2420 e por microscopia.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das espécies patogênicas de <i>Leishmania</i>	22
Tabela 2: Conjuntos de primers desenvolvidos para detecção de <i>L. infantum</i> e <i>Crithidia</i> sp.	41
Tabela 3: Cálculo da massa de DNA equivalente a um parasita.	45
Tabela 4: Proporções do número de parasitas para o ensaio Spike-in.	46
Tabela 5: Parâmetros usados na eletroporação para a transfecção dos genes repórter.	55
Tabela 6: Informações de ID do gene, cromossomo, número de cópias do gene putativo da p-nitrofenilfosfatase em <i>Leishmania</i> spp.	58
Tabela 7: Informações de ID do gene, cromossomo, número de cópias do gene Catalase em <i>Crithidia</i> sp LVH-60A, <i>C. fasciculata</i> e <i>Leptomonas</i> spp.	62
Tabela 8: Valores de coeficiente das curvas padrão de qPCR usando DNA hospedeiro como pano de fundo nas reações.	67
Tabela 9: Amostras de pacientes com LV e isolados clínicos triados por PCR com novos primers para o marcador SSU rRNA (18S).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA- Leishmaniose tegumentar americana
LC- Leishmaniose cutânea
LMC- Leishmaniose mucocutânea
LV- Leishmaniose Visceral
OMS- Organização Mundial da Saúde
OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde
 μm - Micrometro
 Sb^{+5} - Antimoniais pentavalentes
RIFI- Imunofluorescência indireta
ELISA- Ensaio imunoenzimático
DAT- Teste de aglutinação direta
IFAT- Teste de anticorpos imunofluorescente
rk39 RDT - teste imunocromatográfico para Leishmaniose
PCR- *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR- *Real time quantitative PCR* (PCR em tempo real)
DNA- Ácido desoxirribonucleico
SSU rRNA- subunidade do RNA ribossomal
ITS- região do espaçador transcrito interno ribossômico
kDNA- Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
dsDNA- *Double stranded DNA* (ácidos nucleicos de cadeia dupla)
LAMP- amplificação isotérmica mediada por loop
TriTrypDB- banco de dados de tripanossomatídeos
Primer-Blast- ferramenta para o design de *primers*
BLASTN- Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
HUUFS14 – cepa de *Leishmania infantum*
JPCM5 - referência *L. infantum* dos bancos de dados
 μL - Microlitro
g- Unidade de medida de força relativa da centrifuga
RNase- Ribonuclease
CWS - Column Wash Solution
WHO/MHOM/BR/74/PP75- cepa de *L. infantum*
MHOM/BR/1973/M2269- cepa de *L. amazonensis*
IFLA/BR/67/PH8- cepa de *L. amazonenses*
M2269 - cepa de *L. amazonenses*
MHOM/BR/75/M2903- cepa de *L. braziliensis*

LTCP15171- cepa de *L. braziliensis*
LTCP393- cepa de *L. braziliensis*
M2903- cepa de *L. braziliensis*
SBF – Soro bovino fetal
LVH60_C3- isolado *Crithidia* sp LVH60A
LVH117_C1- isolado *Crithidia* sp LVH60A
LVH120_C5- isolado *Crithidia* sp LVH60A
TCC039E- cepa de *C. fasciculata*
Y- Cepa de *Trypanosoma cruzi*
LIT- infusão hepática de triptose
THP-1- Linhagem celular humana derivada de leucemia monocítica aguda
RPMI 1640 – Meios de cultura celular clássico para células eucarióticas
CO₂- Dióxido de carbono
PMA- Phorbol 12-Miristato 13-Acetato
CDC- Armadilha luminosa tipo CDC (*Center on Disease Control*)
Lutzodex- aplicativo para identificação de insetos vetores
µM- micromolar
ERV-3- Gene endógeno retrovírus grupo 3
G3PDH- Gene gliceraldeído 3-fosfato da desidrogenase
IVS6- Gene cacofônico
s- Segundos
°C- graus Celsius
Mb- Megabases
bp- pares de base
NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de informações sobre biotecnologia)
fg- Fentograma
ng- Nanograma
CV- Coeficiente de variação
Cq- *Cycle Threshold*
h- Horas
PNA- *Peanut Agglutinin*
HUUFS- Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe
TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEUA- USP/FZEA- Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

CEUA- FMRP/ USP- Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

SISBIO- Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade

mM- Milimolar

Tris- hidroximetil aminometano

HCl- ácido clorídrico

(NH₄)₂SO₄. Sulfato de amônia

dNTP- desoxinucleosídeos trifostatos

MgCl₂- Cloreto de magnésio

pmol- picomol

ML- Método de Máxima Verossimilhança

G- Guanidina

C- Citosina

A- Adenina

T- Timina

T_m- Temperatura de *melting*

g- Gramas

Eff- Porcentagem de eficiência

R²- Coeficiente de determinação da reação

ΔC_q- Variação de C_q

PKDL- Leishmaniose dérmica pós calazar

BMLV- Medula óssea

PB- Sangue periférico

CI- Isolados clínicos

RNA- Ácido ribonucleico

PTU- Unidade de transcrição policistrônica

pH- Potencial hidrogeniônico

CAT- Cloranfenicol acetiltransferase

GFP- Proteína fluorescente verde

EGFP- Proteína verde fluorescente aprimorado

YFP- Proteína fluorescente amarelo

RFP- Proteína fluorescente vermelho

LVH60a_C1- *Crithidia* sp LVH60A

pSSU_EGFP-C1/Neo – vetor com gene EGFP com resistência a neomicina

pSSU_mCherry-C1/Neo- vetor com gene mCherry com resistência a neomicina

FMRP/USP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

rpm- Rotação por minuto

LB- Meio de cultivo líquido Luria Bertan

LB-ágar- Meio de cultivo líquido Luria Bertan associado ao ágar

UFC- Unidades formadoras de colônias

DL₅₀- Dose letal

G418 - Antibiótico aminoglicosídeo análogo a neomicina

EPB- Tampão para eletroporação

NaCl- Cloreto de Sódio

KCl- Cloreto de potássio

Na₂HPO₄ - fosfato dissódico

µg- Micrograma

V- Voltagem

µF- Capacitância

∞ - Símbolo infinito

WT- *Wild type* (WT)

PBS - tampão fosfato salino

DH5α- bactéria *Escherichia coli* cálcio competente

mL- Mililitro

DsRed- Proteína vermelho fluorescente derivada de *Discosoma*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
1.1.	AS LEISHMANIOSES.....	22
1.2.	TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	26
1.3.	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL.....	27
1.4.	GENES REPÓRTERES PARA O ESTUDO DE <i>LEISHMANIA</i>	30
1.5.	CONTEXTO DE CO-INFECÇÕES POR TRIPANOSSOMATÍDEOS MONOXÊNICOS EM LEISHMANIOSE	32
2.	OBJETIVOS	38
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1.1.	METODOLOGIA PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE PARASITAS.....	40
3.1.2.	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	40
3.1.3.	MÉTODOS DE CULTIVO.....	41
3.1.4.	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDOS E CÉLULAS.....	42
3.1.5.	PERFORMANCE DOS ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR)	43
3.1.6.	CÁLCULO PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO EM QPCR	44
3.1.7.	ENSAIO DE <i>SPIKE-IN</i> COM O DNA DOS PROTOZOÁRIOS E HOSPEDEIROS VERTEBRADOS.....	46
3.2.	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL.....	46
3.2.1.	INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> COM MACRÓFAGOS THP-1.....	46
3.2.2.	INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> COM <i>L. INFANTUM</i>	47
3.2.3.	VALIDAÇÃO BIOLÓGICA.....	48
3.2.4.	ORIGEM DAS AMOSTRAS E COMITÊ DE ÉTICA	48
3.2.5.	PCR CONVENCIONAL E SEQUENCIAMENTO SANGER	49
3.2.6.	ANÁLISE DE DADOS.....	50
3.3.	TÉCNICAS DE ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFEÇÃO CELULAR PARA EXPRESSÃO DE GENES REPÓRTERES.....	50
3.3.1.	ORIGEM DAS CULTURAS E MANUTENÇÃO CELULAR.....	51
3.3.2.	VETORES PSSU_EGFP-C1/ NEO E PSSU_MCHERRY-C1/ NEO.....	51

3.3.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ANTIBIÓTICO G418 NA SELEÇÃO DA CEPA LVH60A_C1 TRANSFECTANTE	53
3.3.4. TRANSFEÇÃO DE GENES REPÓRTER POR ELETROPORAÇÃO	54
3.3.5. CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM DE <i>L. INFANTUM</i> EXPRESSANDO PROTEÍNA VERMELHO FLUORESCENTE (HUUFS14_ PSSU_ MCHERRY-C1/NEO).....	56
4. RESULTADOS	58
4.1. PERFORMANCE DOS PRIMERS E VALIDAÇÃO DOS ALVOS PARA QPCR	58
4.1.1. CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO E ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE.....	65
4.1.2. ENSAIO <i>SPIKE-IN</i> COM <i>PRIMERS</i> LINJ31_2420 E CATALASE_LVH60-12060_1F	69
4.2. VALIDAÇÃO DO NOVO ENSAIO DE QPCR EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	71
4.2.1. INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE THP-1 COM <i>L. INFANTUM</i>	71
4.2.2. INFECÇÃO EM MODELO ANIMAL	74
4.3. VALIDAÇÃO DOS NOVOS ALVOS EM ISOLADOS CLÍNICOS, AMOSTRAS DE TECIDOS DE HOSPEDEIROS VERTEBRADOS E VETORES.....	74
4.4. TRANSFEÇÃO DE PARASITAS COM GENE REPÓRTER FLUORESCENTE.....	79
4.4.1. CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM DE HUUFS14_MCHERRY	82
5. DISCUSSÃO.....	86
5.1. ALVOS GÊNICOS ESPÉCIE- ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE PARASITAS	86
5.2. LINHAGEM DE PARASITA EXPRESSANDO GENE REPÓRTER FLUORESCENTE	91
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8. APÊNDICE	115
9. ANEXO	123

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas que representam um importante problema para a saúde pública em países que são endêmicas. A doença é decorrente da infecção causada pelo parasita do gênero *Leishmania* (Maxfield; Crane, 2022; World Health Organization - WHO, 2023). O quadro clínico decorrente da infecção depende da espécie do parasita causador e a interação com o hospedeiro (Azami-Conesa; Gómez-Muñoz; Martínez-Díaz, 2021).

Cerca de 22 espécies de *Leishmania* possuem a capacidade de infectar mamíferos resultando em diferentes patologias. Apesar da morfologia celular semelhante, existem diferentes espécies responsáveis por desencadear as variadas formas clínicas (Alvar *et al.*, 2012; Maxfield; Crane, 2022; Steverding, 2017) como apresentada na Tabela 1. A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) se manifesta através de lesões cutâneas, que podem variar entre os casos de Leishmaniose cutânea (LC) e a inflamação mucosa na forma de Leishmaniose mucocutânea (LMC) (Herwaldt, 1999; Reithinger *et al.*, 2007). A forma grave da doença é a Leishmaniose Visceral (LV) acometendo órgãos internos como baço, medula óssea, fígado e linfonodos podendo ser fatal quando não diagnosticada e/ou tratada adequadamente (CDC-Centers for Disease Control and, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que número de novos casos de Leishmanioses anualmente varie de 700 mil à 1 milhão (World Health Organization - WHO, 2023). Esta enfermidade engloba o grupo das principais doenças tropicais negligenciadas com endemicidade em 99 países, sendo a LC notificada em 89 países e LV em 80 países, e ambas as formas da doença em 71 localidades (PAHO/WHO | Pan American Health Organization, 2022b).

Tabela 1: Classificação das espécies patogênicas de *Leishmania*.

Subgênero	Espécie	Tropismo/Forma clínica
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	Visceral e Leishmaniose dérmica pós-calazar
	<i>L. tropica</i>	Cutânea
	<i>L. major</i>	Cutânea
	<i>L. aethiopica</i>	Cutânea
	<i>L. infantum/chagasi</i>	Visceral
	<i>L. mexicana</i>	Cutânea
	<i>L. amazonensis</i>	Cutânea
	<i>L. venezuelensis</i>	Cutânea
	<i>L. braziliensis</i>	Mucocutânea
<i>Viannia</i>	<i>L. peruviana</i>	Cutânea
	<i>L. guyanensis</i>	Mucocutânea
	<i>L. panamensis</i>	Mucocutânea

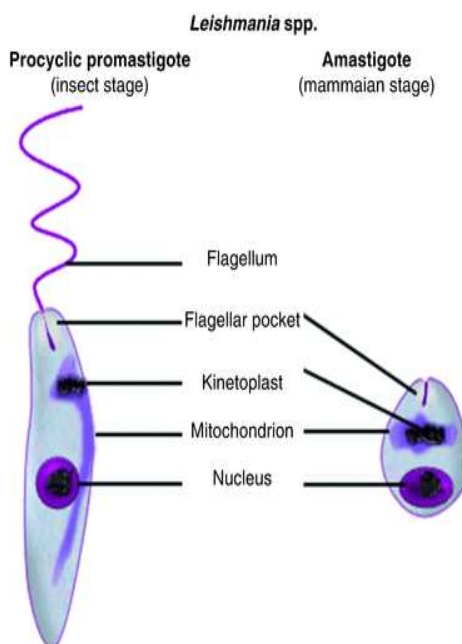
Tabela adaptada de Herwaldt (HERWALDT, 1999).

Os vetores com capacidade de hospedar esses tripanossomatídeos são flebotomíneos (Ordem Díptera) da família Psychodidae. Esses insetos estão predominantemente presentes em áreas subtropicais e tropicais habitando ambientes relativamente úmidos e quentes que propiciam a sua proliferação (World Health Organization - WHO, 2023). Flebotomíneos fêmeas alimentam-se do sangue de mamíferos, uma vez que a hematofagia é essencial para a oviposição (Steverding, 2017). Os parasitas *Leishmania* são transmitidos por meio da picada desses insetos flebotomíneos. Com isso a ampla gama de hospedeiros mamíferos envolvidos (humanos, canídeos, felinos, marsupiais e roedores) na Leishmaniose exibe padrões de transmissão tanto zoonóticos quanto antroponóticos (Claborn, 2010; Steverding, 2017).

Os dípteros com a capacidade de transmitir a *Leishmania* são descritos como as espécies distribuídas pelo Velho Mundo (gênero *Phlebotomus*) e as do Novo Mundo (gênero *Lutzomyia*) (Herwaldt, 1999). Este último gênero está presente nas Américas e é encontrado no Brasil. As espécies relacionadas à transmissão das Leishmanioses no país são *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, *Nyssomyia whitmani*, algumas espécies do gênero *Pintomyia* conhecidas popularmente como "mosquito-palha," "asa branca" ou "birigui" (Akhoundi *et al.*, 2016; Brasil, 2014; da Costa; Cordeiro; Rangel, 2018; de Oliveira *et al.*, 2017; de Sousa *et al.*, 2023).

Leishmania exibe duas morfologias distintas (Figura 1) ao longo de seu ciclo de vida: a forma promastigota, caracterizada por seu corpo celular alongada e a presença de flagelo (15-28 μm x 1,5-3,5 μm), encontrada nas microvilosidades intestinais do vetor; e a forma amastigota com formato arredondado (2-5 μm) que reside intracelularmente nas células fagocíticas de hospedeiros vertebrados (Claborn, 2010; Hommel, 1999).

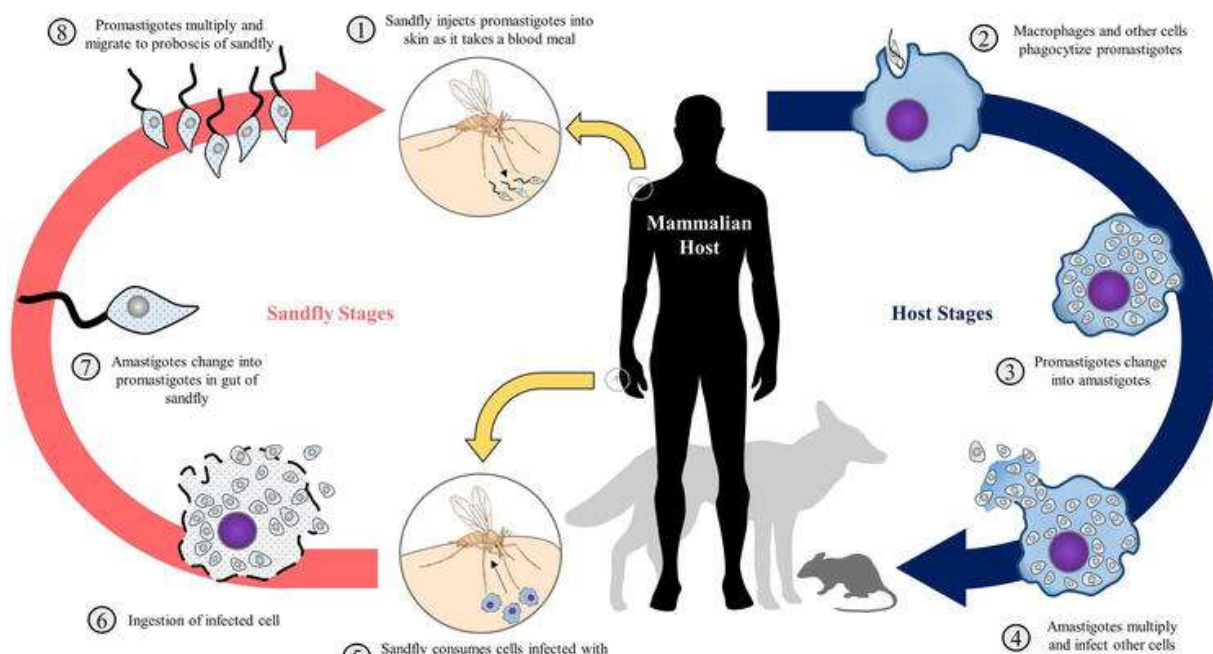
Figura 1: Morfologia celular de *Leishmania*.



Representação das morfologias celulares de *Leishmania* spp. Reproduzido do trabalho de Rodriguez *et al.* (Rodriguez *et al.*, 2018).

O ciclo de vida desses protozoários tem início durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebotomíneo infectado realiza uma picada para se alimentar do sangue de um mamífero, regurgitando as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*. O parasita flagelado interage com as células fagocíticas mononucleares do sistema imunológico do hospedeiro, incluindo macrófagos e células dendríticas. Uma vez fagocitado o parasita passa por uma diferenciação morfológica para a forma amastigota, onde permanece dentro do vacúolo parasitóforo. Nesse ambiente, o parasita se reproduz por fissão binária. Uma única célula infectada pode conter aproximadamente 20 ou mais formas amastigotas, que são liberadas após o extravasamento celular para invadir outras células. O flebotomo adquire as formas amastigotas ao se alimentar do sangue do hospedeiro mamífero infectado. No interior do vetor, ocorre a diferenciação dessas formas para a forma promastigota procíclica seguida da forma promastigota metacíclica, que migram para o aparato bucal do flebotomíneo durante a hematofagia reiniciando assim o ciclo (Aronson *et al.*, 2016; Bates, 2018; Claborn, 2010; Gossage; Rogers; Bates, 2003; Uliana; Trinconi; Coelho, 2018). A Figura 2 esquematiza o ciclo de vida de *Leishmania*.

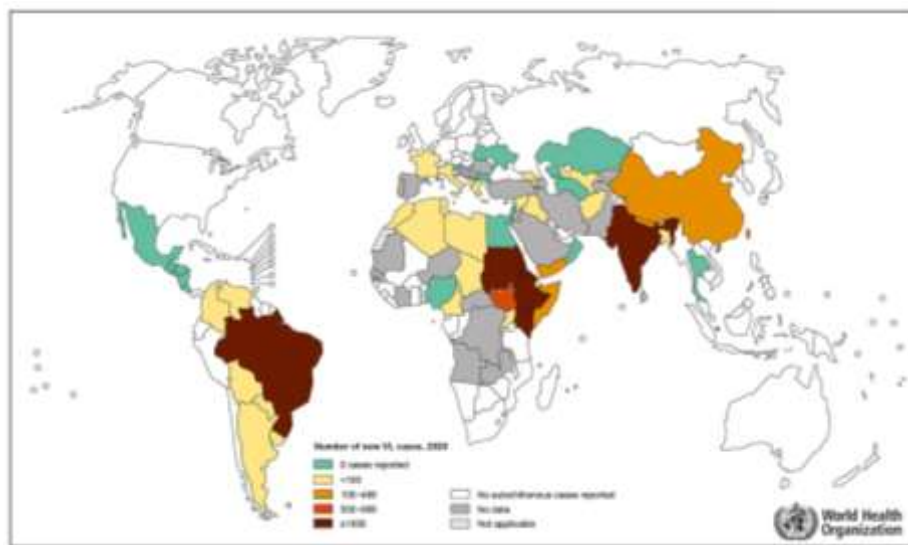
Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania*.



Esquema representando a morfologia e o ciclo de vida de *Leishmania* spp. Reproduzido do estudo de Sheikh *et al.* (Sheikh *et al.*, 2020).

A LV é a forma clínica mais grave e fatal se não tratada adequadamente. O agente etiológico é a *Leishmania donovani* nos países do Velho Mundo e *Leishmania infantum* em países do Novo Mundo (Azami-Conesa; Gómez-Muñoz; Martínez-Díaz, 2021; PAHO/WHO | Pan American Health Organization, 2022b). Brasil, Índia, Quênia e Sudão são os países que correspondem a 68% dos casos de LV, como mostrado na Figura 3. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) identificou no período de 2001-2021 o registro de 69.665 novos casos de LV nas Américas considerando uma taxa de letalidade alta em comparação aos outros continentes (PAHO/WHO | Pan American Health Organization, 2022a). No ano de 2021, a taxa de incidência e o número de casos de LV revelaram que o Brasil apresenta índices elevados. Neste mesmo período o país concentrou 93,5% de casos registrados para LV e níveis de transmissão da doença considerados de alto à muito intenso (PAHO/WHO | Pan American Health Organization, 2022a).

Figura 3: Endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.



Distribuição dos casos de LV no mundo. Mapa reproduzido da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO, 2023).

1.2. Tratamento e prevenção da Leishmaniose Visceral

Os medicamentos antileishmania recebem baixa atenção e pouco investimento por parte dos governos e laboratórios farmacêuticos com relação ao desenvolvimento de novos fármacos eficazes. Apesar da existência de medicamentos usadas no tratamento da LV, estes compostos provêm de formulações de medicamento antigos que requerem uma administração parental prolongada com toxicidade alta e efeitos colaterais graves (Croft; Yardley, 2002; Vermelho *et al.*, 2014).

Uma preocupação sobre esses fármacos é a resistência do parasita aos medicamentos empregados no tratamento da LV. Diversos fatores, como exposição repetida a fármacos, genética do parasita e a complexa interação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro, podem contribuir para o desenvolvimento de resistência (Croft; Yardley, 2002; Shahnaz *et al.*, 2018; Sundar; Chakravarty, 2010).

No tratamento da LV são usados antimoniais pentavalentes (N-methyl glucamine e estibogluconato de sódio), Anfotericina B Liposomal, Anfotericina B Desoxicolato e alternativamente estão sendo usados outros medicamentos como miltefosina e paromomicina (Carnielli *et al.*, 2018; Kobets; Grekov; Lipoldova, 2012; Mishra; Saxena; Singh, 2007). A eficácia desses agentes quimioterápicos varia de acordo com o estado imunológico do paciente e a resistência do parasita ao fármaco (van Griensven; Diro, 2019). Conforme as diretrizes para o tratamento das Leishmanioses na região das Américas divulgado pela OPAS, recomenda-se fortemente o uso de anfotericina B lipossomal nos casos pediátricos e adultos com monitoramento hospitalar rigoroso para avaliação da toxicidade (Pan American Health Organization, 2022). No Brasil, os compostos derivados de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5})

como o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime) e a Anfotericina B Liposomal são usados para o tratamento da LV (Brasil, 2014; World Health Organization - WHO, 2023).

Como medidas preventivas, recomendam-se abordagens multifacetadas para evitar os riscos de transmissão da LV envolvendo atividades de estímulo à proteção individual como uso de repelentes, uso de telas e mosquiteiros nos domicílios, evitar atividades em ambientes e horários em que há ocorrência de vetores. Medidas de proteção coletiva como controle de vetores nas residências por meio de inseticidas, vigilância entomológica, cuidados e tratamentos necessários para os animais domésticos, a busca por informações e educação, além de seguir as orientações da vigilância epidemiológica (Brasil, 2014; World Health Organization - WHO, 2023) também são abordagens recomendadas para prevenção da doença.

1.3. Métodos diagnósticos para a Leishmaniose Visceral

A LV possui uma sintomatologia ampla que depende da evolução da infecção variando de manifestações oligossintomáticas (sintomas discretos), moderadas e graves que pode levar a óbito quando não diagnosticadas e tratadas a tempo (Brasil, 2014). Durante a fase aguda, os sintomas apresentados incluem febre prolongada e irregular, caquexia, esplenomegalia, anemia severa, perda de peso, pancitopenia e hepatomegalia, e nos casos mais graves pode ocorrer anasarca (Brasil, 2014; World Health Organization - WHO, 2023).

O diagnóstico da LV envolve uma variedade de técnicas que abrangem exames sorológicos e parasitológicos. As técnicas parasitológicas podem ser diretas, como as análises histopatológicas de amostras da medula óssea e de tecidos para visualização de formas amastigotas ou de técnicas indiretas como o isolamento do parasita por meio de cultivo em culturas específicas para *Leishmania* (Aronson *et al.*, 2016). Tanto a visualização direta do parasita quanto a de cultivo estão acessíveis nos grandes centros de saúde e/ou institutos de pesquisa especializados para investigar casos de LV. No entanto, a sensibilidade varia e é influenciada pela quantidade de parasitas na amostra clínica, bem como pela habilidade e capacitação dos profissionais em identificar e realizar as técnicas necessárias (Rashid, 2014).

Os métodos sorológicos são considerados não invasivos e geralmente oferecem resultados rápidos, pois se baseiam na detecção de anticorpos contra *Leishmania* e de seus antígenos. No entanto, sua sensibilidade e especificidade podem variar, além disso, esses métodos podem apresentar reatividade cruzada com outras espécies de tripanossomatídeos (Freire *et al.*, 2019; Rashid, 2014).

Os exames sorológicos englobam uma variedade de testes, tais como a imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), o teste de aglutinação direta (DAT), o teste de anticorpos imunofluorescente (IFAT) e o teste imunocromatográfico

(rk39 RDT) (Freire *et al.*, 2019; Rashid, 2014; World Health Organization, 2008). Conforme o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil, 2014), no Brasil os diagnósticos sorológicos utilizados são o ELISA e RIFI. O diagnóstico para a LV é concluído quando, além da apresentação de dados clínicos, o exame sorológico é reagente e então inicia-se o tratamento. No entanto, se um teste é reagente na ausência de manifestações clínicas, o diagnóstico não é fechado e não é autorizado o tratamento. Casos assim são considerados assintomático (Brasil, 2014).

Além dessas abordagens, também é possível utilizar ferramentas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, em amostras obtidas tanto da medula óssea quanto do sangue periférico. Esse enfoque complementa os demais exames, oferecendo suporte às pesquisas e investigações epidemiológicas (Aronson *et al.*, 2016; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, houve um notável avanço no campo da biologia molecular, especialmente no contexto das abordagens genômicas e no desenvolvimento de ferramentas que desempenham um papel fundamental tanto na pesquisa quanto na área da saúde. As técnicas moleculares demonstram uma alta sensibilidade e especificidade, permitindo sua aplicação em diversas amostras clínicas (Buckingham, 2019; Fakruddin *et al.*, 2013). A abordagem molecular tem a capacidade de detectar infecções, proporcionar diagnósticos precisos e até mesmo monitorar a resistência a medicamentos. Com a crescente demanda por respostas para várias doenças e a necessidade de compreender os mecanismos de interação entre patógeno e hospedeiro em nível molecular, o progresso contínuo da ciência e da pesquisa impulsionou o desenvolvimento de métodos moleculares (Buckingham, 2019; Netto; Saad, 2005).

Para o diagnóstico e a investigação de doenças negligenciadas, como a LV, as abordagens moleculares estão sendo empregadas não somente para a detecção do parasita, mas também para a identificação e a compreensão da diversidade das espécies de *Leishmania*, bem como sua distribuição possibilitando uma visão mais abrangente da ecoepidemiologia e das variações populacionais desses parasitas (Guerbouj *et al.*, 2014). Os principais métodos moleculares são baseados no uso de ácidos nucleicos do parasita. Ensaio como PCR ou PCR quantitativo em tempo real (qPCR) vem sendo validados para o diagnóstico da LV (Sundar; Rai, 2002; Sundar; Singh, 2018).

A PCR é uma ferramenta versátil que oferece detecção do material genético através da amplificação de regiões alvos do gene do parasita em diversos tipos de amostras (clínicas, experimentais e de animais), o que torna um método preciso e confiável (Sundar; Singh, 2018). Uma das vantagens notáveis é a sua interpretação simples por meio de eletroforese em gel de agarose com foco qualitativo. No entanto, é importante destacar algumas limitações

associadas a essa abordagem como o tempo e condições necessárias para o processamento da amostra, mão de obra especializada, equipamentos de alto custo e risco de contaminação devido à manipulação direta (Wanger et al., 2017). Vale ressaltar que os ensaios de PCR exibem uma sensibilidade variável, uma vez que ela depende da carga parasitária presente na amostra clínica, dos métodos de extração e preservação do DNA, bem como da região escolhida para o desenho dos *primers* usados durante os ciclos de amplificação (Sundar; Singh, 2018).

Diversos alvos foram desenhados e empregados em diversos protocolos de PCR disponíveis na literatura científica, sendo os mais frequentemente mencionados: os baseados no DNA nuclear, como o gene da região 18S da subunidade do RNA ribossômico (SSU rRNA) (Filgueira et al., 2020; Noyes et al., 1999; Srivastava et al., 2011; Sundar; Singh, 2018; Tsokana et al., 2014), da região do espaçador transcrito interno ribossômico (ITS) (Rezaei et al., 2020; Schönian et al., 2003) e regiões repetitivas do DNA mitocondrial (contido no cinetoplasto, conhecido como kDNA) (Abbasi et al., 2013; Tsokana et al., 2014; Weirather et al., 2011), porém ainda há uma lacuna em relação a um ensaio de PCR universal padronizado que possa ser amplamente adotado pelos centros de diagnóstico de LV. Isso se deve ao fato de que a maioria dos protocolos existentes é desenvolvida em laboratórios de institutos de pesquisa (Tsokana et al., 2014).

A PCR em tempo real (qPCR) representa uma variação da técnica original de PCR. Neste método, a amplificação do material genético pode ser monitorada em tempo real, resultando em uma aplicação mais precisa com uso de pouco material genético na geração de dados robustos com alta confiabilidade, dispensando o uso de géis eletroforéticos (Netto; Saad; Dysert, 2003). A técnica de qPCR envolve um sistema que permite a visualização simultânea da amplificação e da detecção do produto refletindo a quantificação através da emissão de fluorescência à medida que o material genético é amplificado. Essa emissão de fluorescência pode ser obtida por meio de intercalantes inespecíficos, que se ligam à dupla hélice de DNA ou por meio de sondas fluorescentes específicas direcionadas à região a ser amplificada, sendo a fluorescência de ambos os métodos detectada e quantificada pelo equipamento de qPCR (Bell; Ranford-Cartwright, 2002; de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Netto; Saad; Dysert, 2003; Paiva-Cavalcanti; Regis-da-Silva; Gomes, 2010).

As vantagens da aplicação da qPCR no diagnóstico da LV incluem a capacidade de detectar o DNA do parasita com o uso de quantidades mínimas de amostras clínicas e discriminação da espécie envolvida. Também é possível o monitoramento do tratamento, a avaliação da eficácia de novos fármacos por meio de ensaios comparativos, investigações epidemiológicas sobre a distribuição e o acompanhamento de pacientes assintomáticos (Costa et al., 2002; Diotallevi et al., 2020; Sudarshan; Sundar, 2014; Tsokana et al., 2014). No

entanto, é relevante ressaltar que essa abordagem diagnóstica apresenta algumas desvantagens e limitações como custo mais elevado dos materiais e reagentes específicos necessários, a exigência de instalações laboratoriais adequadas, pela necessidade de pessoal treinado para executar a técnica e pela complexidade na análise e interpretação dos resultados obtidos (*Netto; Saad, 2005; Paiva-Cavalcanti; Regis-da-Silva; Gomes, 2010*).

Com base na metodologia da qPCR surge uma derivação conhecida como sistema Multiplex qPCR, os quais empregam mais de um par de *primers* em uma única reação, o que possibilita a amplificação simultânea de várias sequências ao longo do processo de amplificação do DNA. No entanto, trata-se de um sistema que demanda otimização, *design* dos *primers* e processo de ciclagem apropriados, além do uso de sondas caras (*Conter et al., 2018; de Cássia-Pires et al., 2017; Wanger et al., 2017*).

Outra abordagem molecular diagnóstica promissora para a LV é a técnica de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) que tem como objetivo amplificar o DNA alvo utilizando múltiplos *primers* em uma temperatura constante eliminando a necessidade de um termociclador, sendo conduzido em banho-maria simples ou um termobloco, tornando-o viável em cenários com recursos limitados e avaliações em campo. A simplicidade deste protocolo e a ausência de necessidade por equipamentos altamente complexos fazem do LAMP uma opção valiosa para aplicação em campo ou em locais com acesso restrito a tecnologia avançada (*de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Ghosh et al., 2022; Nzelu; Kato; Peters, 2019*).

De maneira geral, para o sucesso do desempenho dos testes que utilizam técnicas de PCR para o diagnóstico de LV são influenciados por diversos fatores cruciais como (I) a qualidade e a técnica de coleta dos tecidos (medula óssea, sangue periférico, biópsia de tecidos, etc) para assegurar a boa obtenção de material genético; (II) a preservação cuidadosa das amostras biológicas após a extração do DNA genômico, garantindo que a integridade do DNA seja mantida e (III) seleção e análise correta das regiões específicas e informativas do DNA para o desenho dos *primers*, a fim de assegurar a especificidade e a eficiência da amplificação (*Bustin et al., 2009; Conter et al., 2019; Reithinger; Dujardin, 2007; Sundar; Singh, 2018*).

1.4. Genes repórteres para o estudo de *Leishmania*

Uma forma de estudar o ciclo biológico e os mecanismos de infecção de *Leishmania*, bem como a eficácia de fármacos, é por meio de modelos experimentais *in vitro* (linhagens de macrófagos humanos e de camundongos) ou *in vivo* (infecção em hamster) (*Handman, 2001; Lang et al., 2005*). Sistemas de genes repórteres é uma tecnologia amplamente usada para tais finalidades permitindo a identificação e análises para compreensão da interação

parasita/hospedeiro. Esses sistemas são empregados na caracterização e estudos sobre o desenvolvimento do parasita e seus mecanismos de proliferação, podendo atuar como marcadores de proteínas alvo, ferramentas para monitoramento da doença e testes com novos fármacos (Boy et al., 2022).

Um gene repórter é caracterizado como um gene capaz de expressar um fenótipo discernível e mensurável em um contexto em que as proteínas endógenas estão predominantemente presentes e incapaz de afetar as células hospedeiras (Boy et al., 2022; Naylor, 1999). Essa metodologia foi aplicada a outros parasitas como *Trypanosoma cruzi* (Alves et al., 2013; Goyard et al., 2014; Kessler et al., 2013) e *Toxoplasma gondii* (Gubbels; Striepen, 2004; Hao et al., 2012; Salehi; Peng, 2012) na busca de novos fármacos para o tratamento e estudos dos processos biológicos desses organismos. De certa forma, a mesma estratégia também foi usada para os estudos com espécies de *Leishmania* como visto na revisão sistemática feita por Boy e colaboradores (Boy et al., 2022) que abrangeu a aplicabilidade de diferentes sistemas fluorescentes e suas respectivas vantagens e desvantagens na utilização do gene repórter em diversos estudos envolvendo *Leishmania*.

Os estudos da interação parasita-hospedeiro podem ser explorado através de parasitas transformados que incorporam e expressam um gene repórter fluorescente por meio da técnica de transfecção (Goyard et al., 2014). A criação de um parasita fluorescente envolve técnicas da engenharia genética, fornecendo ferramentas para manipulação molecular que pode ser facilmente identificado por equipamentos como microscópios de fluorescência, fluorímetros e citometria de fluxo (Sadeghi et al., 2015; Sean Ha et al., 1996).

Em *Leishmania*, a regulação gênica é organizada em unidade de transcrição policistrônica (PTU) o que significa que múltiplos genes codificadores de proteínas são transcritos juntos em um único precursor de RNA. Na ausência de um mecanismo de controle transcricional a regulação desses genes ocorre por meio de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais (Christine Clayton, 2019).

Estudos elaboraram estratégias de expressão constitutiva com o uso de gene repórter em *Leishmania* visando a inserção por recombinação homóloga na região da subunidade ribossomal 18S (SSU rRNA). Essa região é reconhecida como ativa e conservada, apresentando níveis transcricionais substanciais e amplamente usada em diversos estudos (Beattie et al., 2008; Bolhassani et al., 2011; Jara et al., 2019; Lang; Lecoeur; Prina, 2009; Mißlitz et al., 2000; Singh et al., 2009; Taheri; Eskandar; Rafati, 2017). Esses genes repórteres podem ser inseridos para que expressem de forma intracelular, como por exemplo, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), β -galactosidase, proteína fluorescente verde (GFP) e por bioluminescência (luciferase) (Bolhassani et al., 2011; Boy et al., 2022; Naylor, 1999).

Os parasitas recombinantes podem ser transformados com genes estáveis ou transitórios, no caso dos genes estáveis ocorre a transfecção com um DNA que se integra ao genoma do protozoário; já com os genes transitórios o material do vetor permanece em sua forma episomal mantendo a aplicação contínua de uma substância seletiva para não ocorrer perda deste material (Boy et al., 2022).

Um gene repórter amplamente utilizado em ensaios *in vitro* é a proteína verde fluorescente (GFP) e as suas derivações da GFP mutante que fluorescem em um comprimento de onda mais longo como o verde fluorescente aprimorado (EGFP), fluorescente amarela (YFP), fluorescente vermelha (RFP) e proteína fluorescente ciano (CFP) (Dube; Gupta; Singh, 2009; Pulido et al., 2012). A GFP nativa é uma molécula sintetizada originária de um organismo marinho bioluminescente (*Aequorea victoria*), sendo notável pela sua estabilidade cromófora (Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992; Sean Ha et al., 1996).

1.5. Contexto de co-infecções por tripanossomatídeos monoxênicos em Leishmaniose

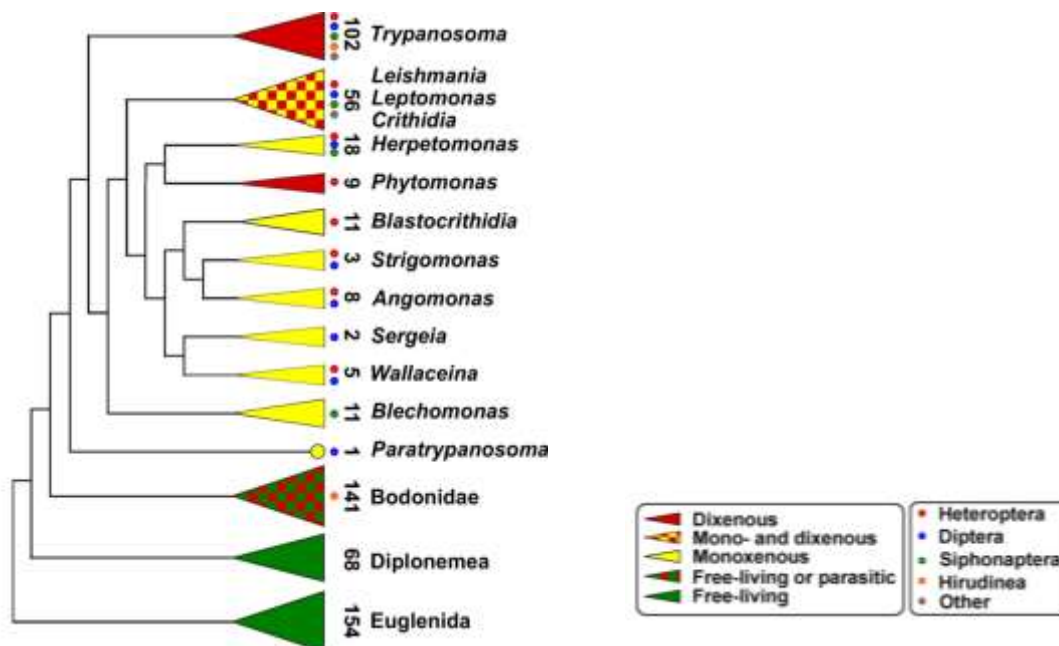
Parasitas do gênero *Leishmania* estão inseridos na ordem Kinetoplastida (família Trypanosomatidae) que abrange um grupo diverso de outros protozoários, sendo de considerável importância clínica (humanos e animais) como os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, e para a agricultura (d'Avila-Levy et al., 2015), como o gênero *Phytomonas*. O gênero Trypanosomatidae são categorizados principalmente com base em suas estratégias de ciclos de vida, sendo divididos em gêneros monoxênicos que parasitam exclusivamente invertebrados, geralmente insetos; e os gêneros dixênicos que precisam parasitar tanto insetos quanto hospedeiros vertebrados para completarem o ciclo de vida (Votýpka et al., 2015).

Trypanosomatidae é uma família diversificada que compreende nove gêneros que abrangem parasitas de ciclo de vida monoxênicos (parasitam apenas insetos) e os parasitas dixênico de que alternam o ciclo de vida entre insetos vetores e hospedeiros mamíferos ou plantas (Simpson; Stevens; Lukeš, 2006). Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são obrigatoriamente dixênicos e desempenham um papel de relevância médica, causando doenças em seres humanos e animais domésticos. Um outro parasita dixênico pertencente ao gênero *Phytomonas* é transmitido por insetos a plantas (Kaufer et al., 2017; Kostygov et al., 2021). Na subfamília Leishmaniinae, encontramos os parasitas dixênicos dos gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Porcisia* a maioria dos quais é transmitida por flebotomíneos. Além desses, a subfamília inclui espécies monoxênicas dos gêneros *Zelonia*, *Novymonas*, *Borovskya*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e *Crithidia* (Espinosa et al., 2018; Kostygov et al., 2021; Mule et al., 2023).

A abundância e diversidade de insetos propiciaram a adaptação dos tripanossomatídeos monoxênicos, sendo a circulação entre os insetos ocorrendo por transmissão fecal com a ingestão de fezes (coprofagia), necrofagia ou predação. Insetos que hospedam esses parasitas apresentam um hábito alimentar rico de materiais orgânicos a qual em sua maioria os excrementos estão contaminados por essas espécies monoxênicas (Maslov *et al.*, 2013; McGhee; Cosgrove, 1980; Yurchenko; Butenko; Kostygov, 2021). A discussão em torno da origem dos parasitas de ciclo de vida dixênico suportam a ideia de evolução a partir dos parasitas de ciclo de vida monoxênico, além disso, alguns estudos tem documentado a transição de alguns tripanossomatídeos monoxênicos para o dixênico ao serem reportados casos de mamíferos e aves infectados por *Crithidia sp* (McGhee, 1959). De acordo com Lukes *et al.* (Lukeš *et al.*, 2014) muitas espécies de tripanossomatídeos monoxênicos sobrevivem em hospedeiros mamíferos. Os métodos como sequenciamento de Nova Geração (NGS), filogenômica e compração de genomas inteiros envolvem as análises genômicas permitem avaliar os genes que podem estar relacionadas a adaptação dos diferentes grupos de Trypanosomatidae, como por exemplo a investigação de genes presentes ou ausentes em *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Phytomonas*, parasitas com ciclo de vida dixênicos, em comparação aos seus parentes monoxênicos (Lukeš *et al.*, 2014).

Na composição original da taxonomia de Trypanosomatidae, as características foram inicialmente determinadas com base em observações abrangentes das morfologias celulares, posições do núcleo, kDNA e bolsa flagelar ao longo do ciclo de vida do parasita (Hoare; Wallace, 1966; Lukeš *et al.*, 2014). Ficou evidente que a taxonomia fundamentada em morfotipos celulares carece de valor classificatório, uma vez que estão distribuídos de acordo com características celulares observadas. Com o avanço das ferramentas moleculares, como os dados de sequenciamento de DNA, surge uma abordagem mais precisa para estabelecer a posição taxonômica com base no material genético do parasita (Lukeš *et al.*, 2014; Maslov *et al.*, 2013; Votýpka *et al.*, 2015) como representada na Figura 4.

Figura 4: Relações evolutivas entre tripanossomatídeos.



Representação taxônomica baseadas nas análises das sequências de SSU rRNA reproduzidas do trabalho de Lukes (Lukeš *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Crithidia* (Léger, 1902) não são consideradas patogênicas aos vertebrados apresentando um ciclo de vida monoxênico parasitando insetos das ordens Diptera, Hemiptera e Himenoptera (Alcolea *et al.*, 2014; Wallace, 1943). No intestino de diversas espécies de insetos os parasitas de *Crithidia fasciculata* apresentam duas morfologias celulares: as amastigotas que possuem o formato celular arredondadas e são imóveis. As amastigotas de *C. fasciculata* são morfologicamente semelhante às amastigotas do gênero *Leishmania*, exceto por serem extracelulares. A outra morfologia é denominada de coanomastigotas, que apresenta um corpo celular ligeiramente alongado, piriforme, com presença de flagelo curto no pólo apical com bolsa flagelar e apresenta motilidade (Alcolea *et al.*, 2014; Hoare; Wallace, 1966). O parasita *Crithidia fasciculata* se desenvolve no trato intestinal de culicídeos por exemplo. A infecção ocorre pela ingestão das fezes contaminadas por amastigotas eliminadas de um outro inseto. No intestino ocorre a diferenciação para a forma coanomastigota, que por sua vez coloniza esse órgão do inseto, podendo diferenciar-se em amastigotas em determinadas condições. Esses insetos infectados podem contaminar o ambiente com suas fezes contendo as amastigotas e outros insetos se infectam pela ingestão dessas amastigotas (Alcolea; Alonso; Larraga, 2011; Votýpka; Ray; Lukes, 2001; Wallace, 1943). Apesar de sua relação evolutiva com o gênero *Leishmania*, que juntamente com o gênero *Leptomonas* constituem a subfamília Leishmaniinae, estudos envolvendo o gênero *Crithidia* para a compreensão

do ciclo de vida, a biologia celular e molecular ainda são poucos explorados (Alcolea *et al.*, 2014; Votýpka *et al.*, 2015a).

Embora tripanossomatídeos monoxênicos não sejam considerados patogênicos para os mamíferos, estudos têm mostrado evidências de sua presença, principalmente *Leptomonas* e *Crithidia* dentro do contexto de coinfeção com *Leishmania* (Boucinha *et al.*, 2022; Dedet; Pratlong, 2000; Kraeva *et al.*, 2015). A adaptação dos tripanossomatídeos monoxênicos em vertebrados demanda uma investigação mais aprofundada por meio de estudos moleculares para compreender a transição de um ciclo monoxênico para dixênico (Singh; Chikara; Sundar, 2013). Estudos comprovaram a tolerância térmica e sobrevivência desses parasitas em temperaturas de até 37°C (Ishemgulova *et al.*, 2017; Roitman *et al.*, 1977; Silva; Roitman, 1982; Srivastava *et al.*, 2010).

No contexto de coinfeção por tripanossomatídeos monoxênicos, os casos foram demonstrados no estudo de revisão de Boucinha (Boucinha *et al.*, 2022) indicam estudos que evidenciam os casos de coinfeção por *Leptomonas* e *Crithidia*. No trabalho de Srivastava (Srivastava *et al.*, 2010) e Ghosh *et al.* (Ghosh *et al.*, 2012) relataram terem encontrado parasitas do gênero *Leptomonas* em isolados de pacientes com LV da Índia. Um outro estudo com análises do genoma de isolados clínicos, também da Índia, identificou pelas análises por se tratar de *Leptomonas* sp (Singh; Chikara; Sundar, 2013). Não apenas em casos de LV, mas também essas coinfeções foram vistas dentro do espectro da Leishmaniose Cutânea (Thakur *et al.*, 2020).

Coinfeção por *Crithidia* sp. tem sido reportada na literatura em casos de Leishmanioses em que o paciente apresenta múltiplas recidivas e resistência aos tratamentos convencionais (Boucinha *et al.*, 2022). No Brasil foram evidenciados dois estudos de coinfeção entre *L. infantum* e *Crithidia* sp., ambos os pacientes pertencentes a uma mesma região geográfica do país e apresentaram um quadro clínico atípico (Maruyama *et al.*, 2019; Rogerio *et al.*, 2023). As análises filogenômicas conduzidas nestes estudos revelaram que o isolado demonstrava uma maior proximidade com *Crithidia fasciculata*, uma espécie monoxênica que parasita exclusivamente insetos, o qual denominamos como *Crithidia* sp LVH60A (Maruyama *et al.*, 2019; Rogerio *et al.*, 2023). Não apenas dentro do espectro da LV, mas também a presença de *Crithidia* sp. na LC foi descrita no Irã pelos estudos de Ghobakhloo (Ghobakhloo *et al.*, 2019), Mirzapour (MIRZAPOUR *et al.*, 2019), Doudi (Doudi *et al.*, 2015) e Kalantari (Kalantari *et al.*, 2020). Além disso, não apenas em casos de LV humana, mas foram relatados também em outros grupos de hospedeiros mamíferos como apresentado no trabalho de Fakhar (Fakhar *et al.*, 2022) que observaram *Leishmania* sp e *Crithidia* sp. em cães podendo ser potenciais reservatórios domésticos e por Kalantari (Kalantari *et al.*, 2018) que detectaram *Leishmania* sp e *Crithidia* sp. em roedores, ambos os

trabalhos foram evidenciados no Irã. No Brasil, o estudo de Dario e colaboradores (Dario *et al.*, 2021) observou a presença de *Crithidia* sp. em diferentes espécies de animais silvestres (coatis, saguis, cachorros-do-mato, jaguatiricas e morcegos). Um estudo para compreensão da transmissão vetorial foi realizado por Songumpai (Songumpai *et al.*, 2022) na Tailândia, observaram Culicoides (Diptera) como potenciais vetores para *Leishmania* e *Crithidia* sp.

Esses estudos fornecem evidências de coinfeção de *Crithidia* sp. em casos de Leishmanioses, destacando a necessidade de questionamentos mais aprofundados pela comunidade científica para entender o impacto desses tripanossomatídeos monoxênicos nas Leishmanioses.

Neste estudo, foram desenvolvidos *primers* específicos para a detecção e quantificação da carga parasitária em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose visceral (LV), assim como em amostras de modelos experimentais (*in vivo* e *in vitro*). Os conjuntos de *primers* LinJ312420 e LinJ31seq foram projetados para *L. infantum*, enquanto os *primers* Catalase_LVH60-12060_1F, Crid2.1seq e LVH60_Tig001 foram direcionados para espécies relacionadas a *Crithidia*. Neste estudo apresentamos o uso de ferramentas moleculares usando como alvos genes espécies- específicos para a detecção molecular por qPCR como alternativa promissora para diagnóstico molecular de parasitas associados à LV. Adicionalmente, foram realizados ensaios de transfecção celular utilizando genes repórteres nos parasitas relacionados à LV utilizando plasmídeos contendo genes repórteres. O uso de cepas de *L. infantum* *M-cherry* e de *Crithidia* sp. LVH60A GFP têm como propósito facilitar nos estudos de coinfeção, essas abordagens poderão contribuir para a compreensão dos diferentes contextos de infecção e avançar para futuros estudos desses parasitas relacionados a *Crithidia* sp. associados a LV.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo utilizar ferramentas moleculares para desenvolver um método específico de detecção molecular de parasitas relacionados à LV e para gerar cepas geneticamente modificadas de *L. infantum* e do parasito emergente *Crithidia sp.* LVH60A expressando genes repórteres, a fim de fomentar o estudo desses parasitos.

2.2. Objetivos específicos

1) Identificar novos alvos espécie-específico de detecção molecular por meio de análises do genoma de *L. infantum* e de *Crithidia sp.*

2) Avaliar a performance dos *primers* (LinJ31_2420 e Catalase_LVH60-12060_1F) nos ensaios de validações por qPCR.

3) Validar ensaios de PCR e qPCR utilizando *primers* para novos genes espécie-específicos capazes de discriminar as espécies *L. infantum* e *Crithidia sp.* (Maruyama *et al.*, 2019; Rogerio *et al.*, 2023) em modelos experimentais de infecção (*in vitro* e *in vivo*) e em diferentes amostras clínicas relacionadas à Leishmaniose Visceral.

4) Gerar uma linhagem da cepa LVH60a_C1 (*Crithidia sp.* LVH60A) para expressar a proteína verde fluorescente (EGFP) e com a cepa HUUF14 (*L. infantum*) com a proteína vermelha fluorescente mCherry por meio de protocolos de transfecção por eletroporação.

5) Caracterizar as linhagens expressando o gene repórter através da avaliação da curva de crescimento e infecção *in vitro* de macrófagos humanos.

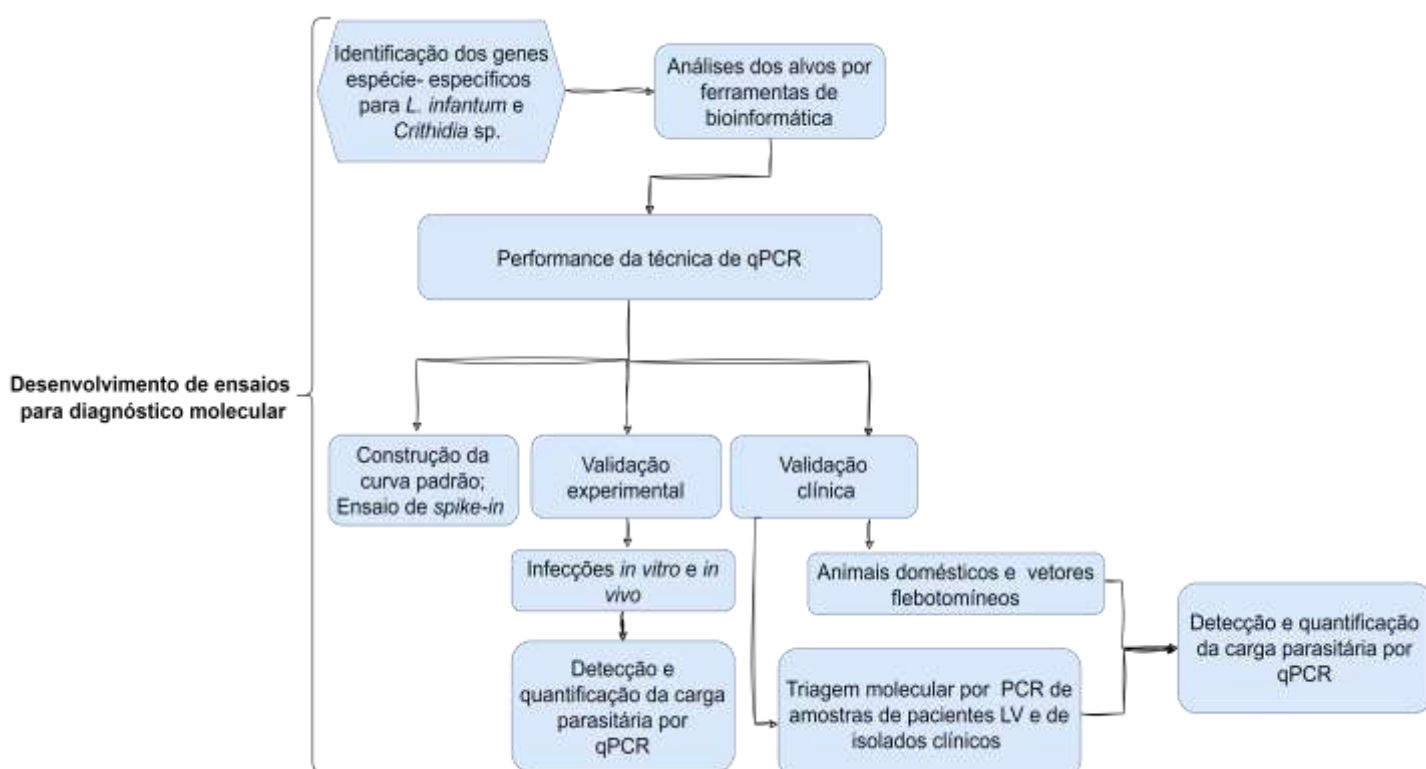
MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. METODOLOGIA PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE PARASITAS

A Figura 5 apresenta o fluxograma de atividades desenvolvidas durante a parte de validação dos novos alvos de detecção espécie- específico de parasitas.

Figura 5: Fluxograma de trabalho evidenciando as etapas e atividades executadas durante a realização deste trabalho no que concerne a parte de detecção específica de parasitas.



3.1.2. Desenho dos *primers*

Foram desenvolvidos conjuntos de *primers* específicos destinados à triagem de isolados clínicos e de amostras por meio da PCR convencional, bem como para a realização de ensaios de qPCR para detecção e quantificação da carga parasitária em amostras clínicas e experimentais. Genes alvos para *L. infantum* foram abordados a partir de análises genômicas feitas pelo trabalho de Rogers *et al.* (Rogers *et al.*, 2011) sendo reanalisados com pesquisas estratégicas das ferramentas TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010). Os *primers* desenvolvidos para *L. infantum* foram baseados no gene LinJ31_2420 ([XM_001467522.1](#)). Para o desenho foi usado a ferramenta *Primer-Blast* (Ye *et al.*, 2012). As sequências dos conjuntos de *primers* estão apresentados na Tabela 2.

Os *primers* para *Crithidia* sp. LVH60A foram projetados utilizando a montagem do genoma do caso estudado por Maruyama (Maruyama *et al.*, 2019) ([GCA_003671345.1](#)). Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer-Blast* (Ye *et al.*, 2012) e também estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Conjuntos de *primers* desenvolvidos para detecção de *L. infantum* e *Crithidia* sp.

<i>Primer</i>	<i>Primer F (5' -3')</i>	<i>Primer R (5'-3')</i>	Tamanho do <i>Amplicon</i>	Funcionalidade
LinJ31seq	GTGCACGCCAATGT CTTTGT	GCCCATGGT TGAGCTAGGTT	444 bp	Detecção de <i>L. infantum</i> por PCR
LinJ31_24 20	GCAGCGATGCGACC TAGTTA	TGTACAAGG CACTGGCGTAG	98 bp	Detecção e quantificação de <i>L. infantum</i> por qPCR
Crid2.1se q	TCACTTTGGCGGTA TCAGTG	GCATCAGCT GACCCTTCTC	502 bp	Detecção de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>C. fasciculata</i> por PCR
LVH60a_ Tig001	GTTAGAGCGACTAG CCCGTG	GGGTAGAGG AGAGAGGTGGG	128 bp	Detecção de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A por PCR
Catalase_ LVH60- 12060_1F	TCAGCGAGTCGGAG TCTAA	CGAATAAGG GTGGAAACAAAG AG	107 bp	Detecção e quantificação de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>C. fasciculata</i> por qPCR

F: *Forward*; R: *Reverse*. bp: pares de base. Tabela de sequência de *primers* reproduzido de (Takamiya *et al.*, 2023)

O gene da catalase de *Crithidia* sp. LVH60A foi identificado por meio de pesquisas BLASTN local. Além disso, buscas de sequência foram realizadas utilizando *amplicons* e as sequências dos *primers* contra sequências genômicas de *Crithidia* sp. LVH60A ([GCA_030078075.1](#)) e a referência *C. fasciculata* (Cf-CI) ([GCA_000331325.2](#)), assim como também foram realizadas com as sequências do *primer* LinJ31_2420 com a referência *L. infantum* JPCM5 (montagem genômica [ASM287v2](#)) e *L. infantum* (cepa HUUFS14) ([GCA_003671315.1](#)), utilizando o parâmetros padrões do algoritmo BLASTN. Também foram realizadas análises dos *amplicons* das sequências dos *primers* contra genomas de outras espécies de *Leishmania*, utilizando BLASTN disponível nos recursos do TriTrypDB.

3.1.3. Métodos de cultivo

As cepas de *Leishmania* utilizadas foram: *L. infantum* (WHO/MHOM/BR/74/PP75 e HUUFS14); *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269 e IFLA/BR/67/PH8) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903, LTCP15171 e LTCP393). Para a obtenção do DNA genômico as culturas promastigotas foram mantidas *in vitro* com Meio Schneider completo contendo 20% de Soro Bovino Fetal (SBF) filtrado e inativado (Gibco™, Grand Island, NY, USA); 1% de

penicilina-streptomicina-glutamina (Gibco™ Carlsbad, CA, USA), 2% de urina masculina filtrada e volume final ajustado com Schneider's Drosophila Medium incompleto (Gibco™ Paisley, NY, USA). As culturas foram mantidas em estufa a 25-27° C. Os isolados de *Crithidia* sp. (LVH60_C3, LVH117_C1 e LVH120_C5) e a cepa de *C. fasciculata* (TCC039E) foram mantidos em cultura com meio Schneider completo contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) filtrado e inativado, 1% de penicilina-streptomicina-glutamina e 2% de urina masculina filtrada, também em estufa a 25-27° C. A cepa de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), em sua forma tripomastigota, foi mantida em Meio Novy-MacNeal-Nicolle (Novy; McNeal, 1904), suplementado com meio de infusão hepática de triptose (LIT) (Luz et al., 1994) e incubada a 27°C por 7 dias.

Os ensaios de infecção *in vitro* foram realizados com monócitos THP-1 (linhagem celular humana derivada de leucemia monocítica aguda). Essas células foram mantidas em frascos de cultura contendo RPMI 1640 completo (10% SBF e 1% penicilina-estreptomicina-glutamina), com o meio foi trocado a cada dois dias e mantido em incubadora à 37°C com 5% de CO₂. Para a diferenciação celular os monócitos foram tratados com 0,1 µM PMA (Phorbol 12-Miristato 13-Acetato) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubado durante 48h a 37°C à 5% de CO₂ para induzir diferenciação em macrófagos aderentes.

3.1.4. Extração de DNA genômico de tecidos e células

A extração do DNA tecidual foi conduzida utilizando o kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante para amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes e cães com LV, bem como amostras de baço e fígado de ensaios experimentais realizados em hamsters. A extração desse material envolveu o uso de 180 µL do PureLink Genomic Digestion Buffer, tratado com 20 µL de Proteinase K, seguido de uma incubação a 55°C por 30 minutos em um aparelho termobloco (Kasvi K80-100). Posteriormente, foi adicionado 20 µL de RNase, agitado vigorosamente ("vortexizado"), e incubado por mais 2 minutos em temperatura ambiente. A etapa subsequente compreendeu a adição de 200 µL de PureLink Genomic Binding Buffer e 200 µL de etanol (96%-100%). O isolamento do DNA foi realizado em coluna (PureLink Spin Columns in Collection tubes), com lavagens sucessivas utilizando PureLink Genomic Wash Buffers 1 e 2. A primeira lavagem foi seguida por centrifugação a 18000 g por 1 minuto, enquanto a segunda durou 3 minutos. Por fim, a coluna foi projetada para um tubo definitivo (PureLink Collection Tubes), onde foram adicionados 30 µL de PureLink Elution Buffer, sendo a coluna incubada por 2 minutos a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 18000 g por 1 minuto.

O DNA genômico de aspirados de medula óssea e sangue periférico de gatos com LV são provenientes do trabalho de Vioti (Vioti *et al.*, 2021). O DNA genômico das culturas de parasitas foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA) o “pellet” celular obtido das culturas foram lisadas com 150 µL do Lysis Buffer e transferido para coluna identificada e centrifugada a 13000 g durante 3 minutos. Em seguida foi acrescentado 650 µL de Column Wash Solution (CWS) e novamente centrifugado a 13000 g x 1 minuto e repetido quatro vezes este procedimento de lavagens com CWS, sendo na última centrifugação a duração de 3 minutos. A eluição foi feita com 30 µL água livre de nucleases tratada com RNase previamente aquecida à 65°C incubando-a por 10 minutos em temperatura ambiente, depois centrifugado a 13000 g x 1 minuto.

O DNA das infecções *in vitro* foi extraído após o período de infecção estabelecido usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega (Madison, WI, EUA).

O DNA dos vetores flebotomíneos foi extraído a partir das partes abdominais dos insetos, utilizando o kit comercial Biopur Kit Extraction Mini Spin Plus (Biometrix, Brasil), conforme descrito no estudo de Ferreira *et al.* (de Sousa Ferreira *et al.*, 2018). Esses vetores foram coletados durante os meses de janeiro a junho de 2014 e 2016 no município de Rio Verde de Mato Grosso, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. A captura dos insetos foi realizada por meio de armadilhas noturnas do tipo luz CDC, montadas nos arredores dos domicílios. O número de fêmeas capturadas em cada *pool* de insetos variou de 10 a 15 indivíduos. Após a coleta, os insetos foram preservados em álcool 70%. Para a identificação das espécies de vetores, diferentes partes do corpo dos insetos foram separadas: as cabeças e as regiões distais do abdômen foram utilizadas, e a identificação foi conduzida com base em chaves taxonômicas conforme Galati *et al.* (Galati *et al.*, 2017) e com auxílio do aplicativo Lutzodex (DE Almeida Rocha *et al.*, 2019; Rocha; Andrade; DE Almeida, 2016).

Os DNA genômicos extraídos foram quantificados e pureza verificada por meio da espectrofotometria em aparelho NanoVue (GE Healthcare) e por fim dosado em aparelho Qubit Fluorometric Quantification (Invitrogen) com o uso do reagente Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) e armazenados sob refrigeração a -20 °C.

3.1.5. Performance dos ensaios de PCR em tempo real (qPCR)

Ensaio de qPCR foram realizadas com o composto fluorescente intercalante entre fita dupla de DNA, foi usado SYBR Green PCR BioSystems (Archway Rd, LDN, UK). O volume final para cada reação de qPCR foi de 10 µL, sendo os reagentes utilizados o 1x SYBR Green separate ROX (PCR BioSystems), 0,2 µM de cada *primer*, molde de DNA conforme a concentração definida nos ensaios e o volume final ajustado com água ultrapura para uso molecular.

Para comparar com os *primers* para *L. infantum* desenvolvido por este estudo foi selecionado um *primer* a partir da literatura científica, também específico para *L. infantum*/*L. donovani*, o LinJ31_L42486.1 (*Primer Forward* 5'- GCGACGTCCGTGGAAAGAA -3' e *Primer Reverse* 5'- GGCGGGTACACATTAGCAGAA- 3') que amplifica um produto com tamanho de 68 pares de bases (Chowdhury et al., 2020; Ghosh et al., 2018; Hossain et al., 2017; Mondal et al., 2019; Vallur et al., 2014).

Pesquisas por *primers* de genes constitutivos dos hospedeiros foram utilizados para serem usados para verificações de qualidade do DNA dos hospedeiros nos ensaios, sendo usado o gene endógeno retrovírus grupo 3 (ERV-3) para DNA humano (*primer Forward* 5'- CATGGGAAGCAAGGGAACTAATG-3' / *Primer Reverse* 5'- CCCAGCGAGCAATACAGAATTT-3') (Adui et al., 2006; Chin Yuan; Miley; Waters, 2001) e para o DNA de animais o gene gliceraldeído 3-fosfato da desidrogenase (G3PDH) (*Primer Forward* 5'-TCAACGGATTTGGCCGTATTGG-3'/ *Primer Reverse* 5'- TGAAGGGGTCATTGATGGCG-3') (Barker et al., 2010; Reis et al., 2013). O *primer* para o gene *cacophone* (IVS6) (*Primer Forward* 5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'/ *Primer Reverse* 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3') (Lins et al., 2002) foi usado no DNA dos vetores flebotomíneos.

Amostras de DNA provenientes de *L. amazonensis* (cepa M2269), *Crithidia* sp. (isolado LVH120_C5), *L. braziliensis* (cepa M2903), *T. cruzi* (cepa Y) e de hospedeiros vertebrados não infectados (humanos, caninos, felinos e camundongos) foram usadas com o objetivo de verificar a ocorrência de amplificação não específica.

Para a ciclagem foram usadas as seguintes condições: 95°C por 20 s para desnaturação, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 s, 60°C por 30 s e uma curva de dissociação a 95°C por 15 s e 60-95°C por 1 min (0,5 °C/5 s).

3.1.6. Cálculo para a construção da curva padrão em qPCR

A quantificação da carga parasitária foi realizada por meio da construção de uma curva padrão, utilizando o DNA genômico extraído das culturas da cepa HUUFS14 (*L. infantum*) e dos isolados LVH120_C5 e LVH60_C3 (*Crithidia* sp LVH60A) considerando a massa de DNA equivalente a um parasita, conforme cálculo baseado no trabalho de Jara *et al.* (Jara *et al.*, 2013). Os cálculos para construção da curva padrão estão apresentados na Tabela 3. Com base nos estudos de Peacock *et al.* (Peacock *et al.*, 2007) e González-de La Fuente *et al.* (González-de la Fuente *et al.*, 2017) o tamanho do genoma de *L. infantum* (cepa JPCM5) é estimado em 32,13 megabases (Mb). Além disso, uma curva padrão foi construída utilizando o *primer* Catalase_LVH60_12060_1F para a análise de amostras de *Crithidia* sp. LVH60A (Maruyama *et al.*, 2019) nessa construção, levou-se em consideração o tamanho

genômico previsto de 34.4 Mb (Takahashi, 2020) disponível no banco de dados NCBI sob o acesso BioProject [PRJNA940846](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA940846).

Tabela 3: Cálculo da massa de DNA equivalente a um parasita.

Massa do parasita (m) = [n x 1.096e-21 g/bp] x ploidia + 15.8% massa do kDNA	
Espécie	Cálculo
<i>L. infantum</i>	Massa de um parasita <i>L. infantum</i> : m = $32.13e6 \text{ bp} \times 1.096e-21 \text{ g/ bp} \times 2 \text{ (n)} =$ 70.4 fg $70.4 + 15.8\% \text{ kDNA} = 81.52 \text{ e-15g}$
<i>Crithidia sp</i> LVH-60A*	Massa de um parasita <i>Crithidia sp</i> LVH-60A (LVH60a) $m = 34.4e6 \text{ bp} \times 1.096e-21 \text{ g/ bp} \times 2 \text{ (n)} =$ 75.4 fg $75.4 \text{ fg} + 15.8\%* = 87.3 \text{ e-15g}$

*Porcentagem da massa do kDNA de *Crithidia sp* LVH-60A kDNA foi considerada para o cálculo como igual a de *Leishmania spp.* Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Com base nesse cálculo, foram determinados os valores para serem usadas nas diluições seriadas que compuseram a curva padrão, abrangendo de 10^5 (100 mil) até 1 parasita por reação nos ensaios utilizando os *primers* LinJ31_2420 e Catalase_LVH60_12060_1F, como demonstrado no Apêndice 1. Foi utilizado material genético de hospedeiros vertebrados (humanos e de animal doméstico) não infectado por nenhum tripanosomatídeo como fundo fixo, com uma quantidade de 3 ng de DNA para cada ponto na curva padrão, simulando uma amostra infectada no qual estão presentes tanto DNA do hospedeiro quanto DNA do parasita.

As análises dos ensaios de reprodutibilidade e repetibilidade foram realizados em duplicatas em dois aparelhos de qPCR: (I) 7500 Fast Dx Real Time PCR Machine (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific) e os dados gerados pelo 7500 Software Fast Real Time PCR Systems v2.0.6 e (II) AriaMx Real- Time PCR System (Agilent) analisados no software AriaMx/ AriaDx. O coeficiente de variação (CV) foi calculado com base na razão entre a média e o desvio padrão dos valores de Cycle Threshold (Cq) das concentrações de parasitas que correspondentes entre 10^5 à 1 parasita (Hossain *et al.*, 2017; Jara *et al.*, 2013).

3.1.7. Ensaio de *spike-in* com o DNA dos protozoários e hospedeiros vertebrados

Um experimento *spike-in* envolve a adição controlada de substâncias conhecidas à amostra a ser analisada. Em nosso trabalho, o *spike-in* consistiu na combinação de DNA genômico de diversos organismos, mantendo proporções conhecidas do DNA de cada espécie (parasitas e hospedeiros). Isso possibilita estabelecer um parâmetro para a validação dos *primers* (Venkataraman *et al.*, 2018) para avaliar a precisão, a sensibilidade e a linearidade do ensaio de qPCR. Para a validação da especificidade e sensibilidade dos *primers* de qPCR LinJ31_2420 e Catalase_LVH60_12060_1F realizamos a simulação de cenário de coinfeção, no qual na mesma reação de qPCR havia tanto DNA do hospedeiro, quanto de duas espécies de parasita. Os ensaios foram realizados em duplicatas com concentrações conhecidas do DNA da cepa HUUF14 (*L. infantum*) misturada ao DNA de *Crithidia* sp LVH60a_C1, como apresentado na Tabela 4, em conjunto com o um *background* de 3 ng do DNA de cada hospedeiro vertebrado.

Tabela 4: Proporções do número de parasitas para o ensaio *Spike-in*.

Nº de parasitas (<i>L. infantum</i>) + background hospedeiro	Nº de parasitas (<i>Crithidia</i> sp LVH-60A) + background hospedeiro
5×10^2	0
5×10^4	0
5×10^2	5×10^2
5×10^2	5×10^4
0	5×10^2
0	5×10^4
5×10^2	5×10^2
5×10^4	5×10^2

Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

3.2. Validação Experimental

3.2.1. Infecção *in vitro* com macrófagos THP-1

Ensaio de infecção *in vitro* usando a cepa de HUUF14 (*L. infantum*), *Crithidia* sp LVH60A (LVH60a_C1 e LVH117_C1) e *C. fasciculata* (TCC039E) foram realizadas em macrófagos THP-1 (linhagem celular humana derivada de leucemia monocítica aguda). A manutenção e diferenciação de monócitos para macrófagos foram descritas no item 3. 1. 2. Antes realizar o plaqueamento para o experimento, a viabilidade das células foi observada

por microscopia com auxílio do azul de Tripán (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) e contabilizadas em câmara de Neubauer obtidas pelo cálculo $(Q1+Q2+Q3+Q4) / 4 \times 10 \times 10^4 \times 2$.

As células THP-1 foram distribuídas em placas de 12 poços na concentração de 1×10^5 células/mL e estimuladas com PMA para a diferenciação em macrófagos, para a posterior infecção e extração de DNA para quantificação por qPCR. Além disso, também foram semeados em placa de 24 poços que continham lamínulas redondas de 10 mm, a concentração de 5×10^5 células/mL, com o intuito de realizar a coloração método Romanowsky com o kit Panótico Rápido (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para posterior contagem microscópica.

As culturas dos parasitas aplicadas na infecção *in vitro* estavam na fase estacionária obtidas no 7-8º dia da passagem e semeadas aos poços na proporção de 10 parasitas para 1 macrófago. As placas em processo de infecção foram inicialmente incubadas durante 3 horas em estufa com temperatura à 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, todos os poços foram lavados com RPMI 1640 incompleto para remoção dos parasitas ainda livres e adicionado RPMI 1640 completo às células infectadas retornando-as à incubação à 37 °C e 5% de CO₂ durante 24h, 48h e 72h pós-infecção.

A quantificação microscópica e avaliação dos macrófagos infectados foi realizada de forma manual visualizada por microscópio óptico na objetiva de 100X, contabilizando por lamínula 100 macrófagos e o número de amastigotas nestas células. Para a detecção e estimativa da carga parasitária foi usado o *primer* LinJ31_2420 e o *primer* LinJ31_L42486.1 (Chowdhury et al., 2020; Ghosh et al., 2018; Hossain et al., 2017; Mondal et al., 2019; Vallur et al., 2014) para as infecções com *L. infantum* e *primer* Catalase_LVH60-12060_1F para as infecções com *Crithidia* sp. Os gráficos com os dados do número de parasitas gerados tanto pela microscopia como pela qPCR foram feitos no programa GraphPad Prism 5.

3.2.2. Infecção *in vivo* com *L. infantum*

Os experimentos de infecção *in vivo* foram originalmente realizados no trabalho de Valeriano (Valeriano, 2022) e as amostras de DNA reutilizadas neste trabalho por meio de colaboração com a Profa. Dra. Isabel K. F. M. Santos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMPR/USP). Resumidamente, hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) com 3 semanas de idade foram separados em grupos de 4 indivíduos e infectados por inoculação via intracardíaca na concentração de $1,7 \times 10^7$ promastigotas metacíclicas em fase estacionária de crescimento selecionadas previamente com Peanult Agglutinin (PNA) [500 µg/mL]. Os isolados clínicos (cepa 515, cepa 1580, cepa 1686 e cepa 1851) usados nas infecções são de pacientes diagnosticados com LV e o isolado identificado como sendo da espécie *L.*

infantum, que realizaram acompanhamento no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela de Teresina/ Piauí, em colaboração com Prof. Dr. Carlos H. N. Costa. Os isolados estão identificados como cepa 1580, cepa 1686, cepa 1851 e cepa 515. Como controle negativo (grupo não infectado) foi aplicado PBS 1x. Os animais foram acompanhados ao longo de nove meses e eutanasiados com quetamine (200mg/ kg) e xylazine (10mg/ Kg) conforme a acentuação dos sinais clínicos da doença. Os órgãos como baços e fígado foram removidos no processo de necropsia e segmentado em porções para extração do DNA genômicos usando o kit comercial Pure Link Genomic DNA mini.

O DNA desses órgãos infectados com os isolados de pacientes LV foi usado em PCR convencional com o *primer* LinJ31seq usando para esta reação o DNA de ~100 ng e analisados por eletroforese de gel de agarose (1%); e na qPCR para detecção e estimativa da carga parasitária com o *primer* LinJ31_2420 foi usado na reação 20ng de DNA.

3.2.3. Validação Biológica

3.2.4. Origem das amostras e comitê de ética

As amostras clínicas (medula óssea, sangue periférico e isolados clínicos) são de pacientes diagnosticados com LV e que realizaram seguimento clínico no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HUUFS) localizado em Aracajú – SE, Brasil. A coleta do material biológico, os isolados clínicos e dados referentes ao prontuário dos pacientes com LV foi possível mediante a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) direcionado a estes pacientes, em protocolo de pesquisa previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HUUFS (CAAE 04587312.2.0000.0058) em parceria com Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida.

A coleta de material biológico de animais domésticos foi autorizada por protocolo de pesquisa sob processo número 6147100518 (DNA de cães) e processo número 632425615 (DNA de gatos) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (CEUA- USP/FZEA) em colaboração do grupo de estudo da Profª. Drª. Trícia M. F. S. Oliveira.

As amostras de DNA das infecções em modelo experimental foram cedidas em colaboração com o grupo da Profª. Drª. Isabel K. F. M. Santos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA- FMRP/ USP) sob o processo número 234/ 201 para uso em hamster sírio realizada com isolados clínicos de pacientes com LV do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela de Teresina/ Piauí aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pesquisa número CAAE 0116.0.045.203-05.

O DNA de vetores são provenientes dos estudos de Ferreira e colaboradores (*de Sousa Ferreira et al., 2018*) em parceria com o Prof. Dr. Rodrigo Gurgel- Gonçalves da Universidade de Brasília. Os vetores foram coletados em locais designados pela vigilância entomológica do município e autorizados pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO) com registro número 33156-2.

3.2.5. PCR convencional e sequenciamento Sanger

Nas reações com PCR convencional foi usado cerca de 100 ng/ reação do DNA do protozoário, 30 ng de DNA humano e 20 ng de DNA animal. Foi usado Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA) constituída por concentrações finais de 1X Taq Buffer (750 mM Tris-HCl de pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM desoxinucleosídeos trifostatos (dNTP) (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA), 0,4 µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 2 mM MgCl₂, 0,05 unidade de Taq DNA Polymerase e água livre de nucleases para compor um volume final de 25 µL na reação. As condições de amplificação para os *primers* LinJ31seq e Crid2.1seq com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido por 34 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. Para o *primer* LVH60a_Tig001 foi configurada a condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos, seguida por amplificação a 95°C por 5 segundos, 40 ciclos a 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. Todas a ciclagens foram realizadas em um termociclador Biometra Tone (Analytikjena, Alemanha).

Para as amostras de pacientes e cães, foi necessário realizar um enriquecimento do produto da primeira PCR utilizando o *primer* LinJ31seq. Esse enriquecimento da PCR foi efetuado através da utilização do produto da primeira PCR, diluído na proporção de 1:10, como *template* para uma segunda reação com o mesmo *primer*. O mesmo procedimento foi aplicado às amostras de flebotomíneos utilizando o *primer* LinJ31_2420. Os produtos das PCRs foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1%) e as imagens foram documentadas usando Chemidoc XR (BioRad Hercules, CA, USA).

As amostras clínicas de pacientes e animais diagnosticados para LV foram triados por meio da técnica de Nested- PCR usando o conjunto de *primers* TRY927 (*Forward* 5'-GAAACAAGAAACACGGGAG -3', *Reverse* 5'-CTACTGGGCAGCTTGGA -3')/ SSU561 (*Forward* 5'-TGGGATAACAAAGGAGCA -3', *Reverse* 5'-CTGAGACTGTAACCTCAAGC -3') (*Noyes et al., 1999*). As reações para sequenciamento de cada amostra consistiram em 3,2 pmol/ µL do *primer Forward* direto de SSU561, volume de produtos de PCR purificados de TRY927/SSU561 com massa entre 10 e 20 ng e água para biologia molecular ajustada para um volume final de 7 µL. O Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied

Biosystems) foi utilizado para o sequenciamento pelo método Sanger (*Sanger; Coulson, 1975*) realizado pelo Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

3.2.6. Análise de dados

Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento de Sanger foram submetidos a controle de qualidade usando o *software* Chromas Versão 2.1.5 (<https://technelysium.com.au/wp/>). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas por meio de Filogenética Molecular. A análise filogenética das sequências de rRNA 18S (SSU) foi conduzida utilizando o *software* MEGA6 (*Tamura et al., 2013*). Árvores filogenéticas contendo as sequências de um paciente LVH60, bem como das amostras de medula óssea e sangue periférico de cães, foram construídas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML) baseado no modelo de Tamura-Nei (*Tamura; Nei, 1993*), com suporte estatístico de *Bootstrap* (1000 réplicas). Sequências correspondentes de rRNA 18S de outras espécies de tripanossomatídeos foram recuperadas do banco de dados NCBI e/ou TriTrypDB por meio de pesquisas BLASTN.

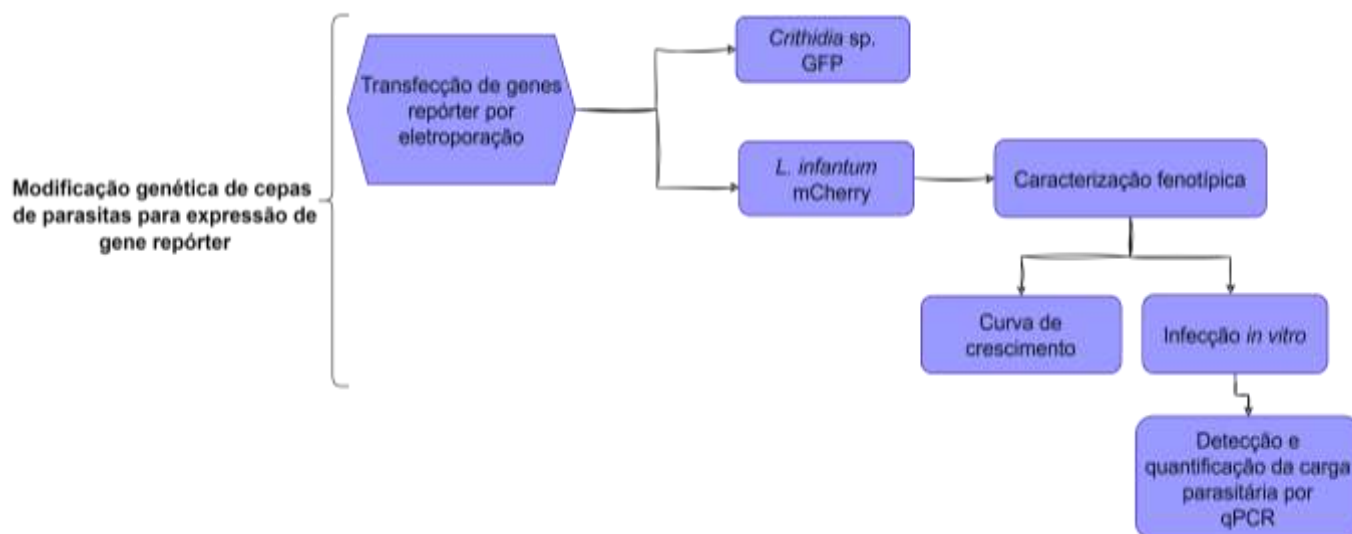
Foram realizadas comparações entre a detecção e eficiência do *primer* LinJ31_2420 em *L. infantum* (cepa HUUFS14) com outro conjunto de *primers* visto na literatura, o LinJ31_L42486.1 (*Chowdhury et al., 2020; Ghosh et al., 2018; Hossain et al., 2017; Mondal et al., 2019; Vallur et al., 2014*). Essa análise envolveu a avaliação dos gráficos de amplificação (valores Cq) e curvas de dissociação. Além disso, parasitas *Crithidia* sp. (cepas LVH60_C3 e LVH117_C1) também foram detectados por meio do *primer* Catalase LV60-12060_1F. As estimativas da eficiência dos *primers* foram conduzidas através da análise dos gráficos de amplificação e das curvas de dissociação geradas pelos *softwares* dos aparelhos de qPCR.

As análises estatísticas do experimento de infecção em modelo experimental *in vivo* e de infecções *in vitro* com macrófagos THP-1 foram conduzidas utilizando o *software* GraphPad Prism Versão 5. O teste estatístico *Two-way* ANOVA foi aplicado aos valores médios das cargas parasitárias estimadas nas reações. A significância estatística foi estabelecida em um nível de $p < 0,05$.

3.3. TÉCNICAS DE ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFEÇÃO CELULAR PARA EXPRESSÃO DE GENES REPÓRTERES

A Figura 6 o fluxograma de atividades desenvolvidas neste trabalho referente a parte de geração de linhagens de parasitas para expressar gene repórter fluorescente.

Figura 6: Fluxograma das atividades executadas referente à transfecção de genes repórteres em cepas de *Crithidia* sp e *L. infantum*.



3.3.1. Origem das culturas e manutenção celular

Os parasitas utilizados nos experimentos de transfecção são a cepa HUUFS14 (*L. infantum*) e LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) isolados de pacientes diagnosticados com LV do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HUUFS) localizado em Aracaju – SE, Brasil. A coleta desses isolados clínicos foi possível mediante a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HUUFS (CAAE 04587312.2.0000.0058). A manutenção do cultivo celular para as espécies de *L. infantum* e de *Crithidia* sp LVH60A estão descritas no item 3. 1. 2.

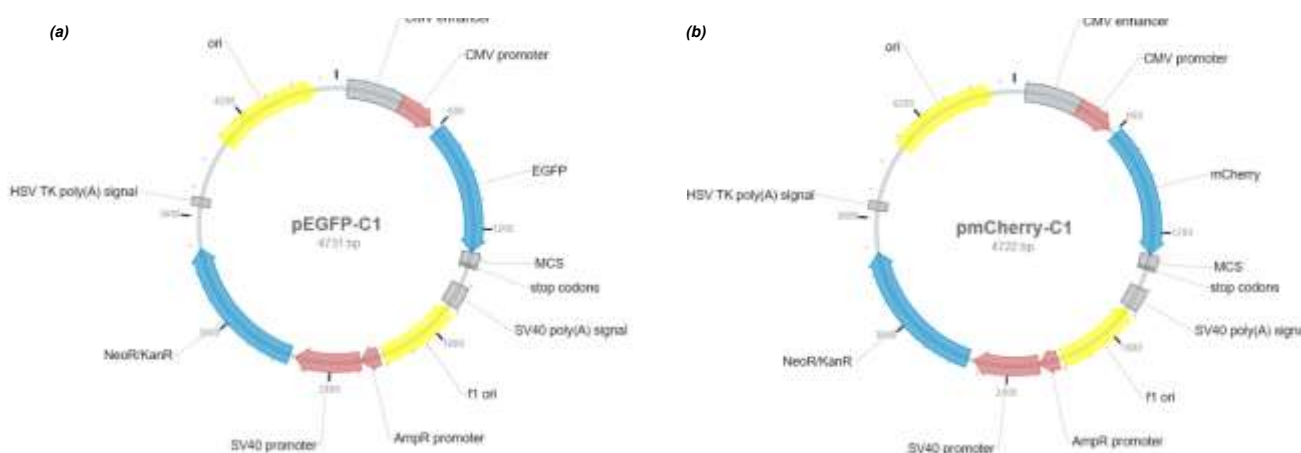
3.3.2. Vetores pSSU_EGFP-C1/ Neo e pSSU_mCherry-C1/ Neo

Estudos envolvendo linhagens de *Leishmania* que expressam um gene repórter, seja por meio de sua incorporação em forma epissomal ou por meio de recombinação homóloga, geralmente se baseiam na construção de um vetor de transfecção que se integram na região da subunidade 18S (SSU rRNA). O gene SSU rRNA é conhecido por ser constantemente expresso o que aumenta significativamente a eficiência da expressão do gene desejado. O vetor de transfecção amplamente utilizado em estudos com *Leishmania* é o vetor pSSU, em que devido à presença do promotor SSU rRNA possibilita a inserção do gene endógeno no parasita, permitindo sua expressão de forma constitutiva (Bolhassani et al., 2011; Jara et al., 2019; Mißlitz et al., 2000). A geração de cepas de *L. infantum* e de *Crithidia* sp. LVH60A, expressando genes repórteres de fluorescência distintos, possibilitará a realização de estudos destinados a compreender os mecanismos de infecção. Isso será realizado por meio de

ensaios *in vitro* com macrófagos para avaliar a infectividade dessas cepas. Além disso, essa abordagem permitirá simular um cenário de coinfeção com esses parasitas, o que auxiliará na compreensão dos mecanismos de infecção e das interações parasita-hospedeiro.

Os vetores pSSU_EGFP-C1/Neo, esquema do mapa do vetor apresentado na figura 6a, e pSSU_mCherry-C1/Neo (Figura 6b) ambos com resistência a neomicina (NEO) (G418) foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Figura 7: Mapa dos vetores pSSU_EGFP-C1/Neo e pSSU_mCherry-C1/ Neo.



Esquemática do mapa do vetor (a) referente ao EGFP-C1/Neo da proteína verde fluorescente e em (b) mapa referente ao mCherry-C1 da proteína vermelha fluorescente. Esquema retirado de <https://novoprolabs.com/vector/>

Para alcançar uma concentração adequada do pSSU_EGFP-C1/Neo e de pSSU_mCherry-C1/Neo foi realizada propagação desses vetores por meio de um processo de transformação em bactérias *E. coli* DH5 α cálcio competentes através de choque térmico.

Em tubo estéril de 1,5 mL foi adicionado 50 μ L de *E. coli* DH5 α e 5 μ L de cada vetor incubado em gelo durante 30 minutos. Posteriormente, essa amostra foi submetida a 42°C (em termo bloco) por 1 minuto e imediatamente colocada em gelo por mais 2 minutos. Depois foram adicionados 800 μ L de meio LB (Luria Bertani) líquido e mantido por 60 minutos em incubadora a 37 °C sob agitação (180 rpm). Decorrido esse processo o tubo foi centrifugado a 5000 rpm x 5 minutos descartando-se o sobrenadante, deixando ao fundo aproximadamente 200 μ L que foi ressuscitado, e com o auxílio da alça de Drigalski essas bactérias foram plaqueadas para crescimento em meio LB-ágar associadas à ampicilina (100 μ g/ mL) deixando-as *overnight* em estufa à 37°C. Observada o crescimento de colônias na placa de cultivo, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas e pré-inoculadas em um tubo de 50mL contendo 5 mL meio LB líquido mais 5 μ L de Ampicilina para obter a

concentração de 100 µg/ mL e incubando em Shaker na velocidade de 180 rpm a 37°C *overnight*. Após esse período 1000 µL do pré-inóculo foi colocado em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB líquido e 100 µg/ mL de Ampicilina e novamente incubado à 37°C *overnight* na velocidade de 180 rpm.

Todo o processo de purificação do plasmídeo foi feito com o Plasmid Midi Kit (Qiagen), conforme recomendações do fabricante por processos que envolvem uma série de lavagens para a lise celular foi feita usando os tampões (P1, P2 e P3), depois o aglomerado celular que ficou visível no tubo foi centrifugado à 20000 g x 30 minutos e o sobrenadante usado no processo de lise das próximas etapas. O início do isolamento do material foi realizado por meio de colunas com membranas previamente umedecidas com o tampão QBT adicionando o sobrenadante com as células bacterianas lisadas e filtrado por gravidade descartando o que passar pela coluna e adicionando tampão QC (20 mL), após a filtração a coluna foi acoplada em tubo novo para eluição e adicionado o tampão QF (5 mL) para que seja filtrado. Antes da eluição esse material filtrado foi lavado com isopropanol 100% e etanol 70% e finalmente eluído com tampão TE do kit. O material obtido a partir da purificação foi quantificado por aparelho fluorímetro Qubit Fluorometric Quantification (Invitrogen) com o uso Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen).

A confirmação dos genes fluorescentes foi feita através da PCR com o *primer* pSSU-NEO (*Forward* 5'- GTTGAGCCGTCCACCGTSG- 3' e o *primer reverse* 5'-GGGCACCGGTTAGGTACC- 3'), os *primers* foram desenhados com base nas análises das sequências da região SSU da cepa de LVH60 e também de *L. infantum*. As reações para PCR consistiram de ~100 ng do material propagado foi usado o kit comercial Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA) constituída por concentrações finais de 1X Taq Buffer (750 mM Tris-HCl de pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM desoxinucleosídeos trifostatos (dNTP) (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA), 0,4 µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 2 mM MgCl₂, 0,05 unidade de Taq DNA Polymerase e água livre de nucleases para compor um volume final de 25 µL na reação. Realizada em termociclador Biometra Tone (Analytikjena, Alemanha) nas condições de ciclagem: 94°C por 3 minutos (1 vez) para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos e depois de 72°C por 7 minutos de extensão final e em seguida visualizadas em gel de eletrofose de agarose (1%) e fotodocumentada em transiluminador de LED (Kasvi).

3.3.3. Avaliação da Eficácia do Antibiótico G418 na Seleção da Cepa LVH60a_C1

Transfectante

A Dose Letal 50% (DL₅₀) é uma medida de toxicidade usada para estimar a quantidade de substâncias tóxicas ou químicas em que estatisticamente 50% dos organismos do grupo não sobreviveram (Robert V. Thurston, 1977). A DL₅₀ com o antibiótico G418 foi empregada para avaliar a resistência da cepa LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) a esse medicamento. O cálculo foi realizado para determinar a concentração ótima do antibiótico a ser utilizada na seleção da linhagem transfectada. A curva foi construída começando com uma densidade de 2x10⁵ parasitas/ mL, submetidas à diferentes dosagens de G418 (15, 30, 40, 60 e 120 µg/mL) em meio Schneider completo (20% SBF). Um grupo controle sem o antibiótico também foi mantido para comparações, esses ensaios foram tratados em triplicata e contagem realizada em um período de 8 dias. A contagem foi feita câmara de Neubauer conduzida por meio de uma diluição de 1:100 das amostras em PBS 1X (2% de formaldeído). Em seguida, foram colocados 10 µL dessa diluição na câmara para contagem em microscópio, o número de células foi calculado pela fórmula: (Q1+Q2+Q3+Q4) / 4 x 10² x 10⁴. A DL₅₀ de G418 para a cepa LVH60a_C1 foi calculada usando o método de Karber (Robert V. Thurston, 1977), conforme o quadro 1.

Quadro 1: Fórmula aplicada no cálculo da DL50:

$$LD50 = LD100 - \left\{ \frac{\sum [\text{diferença de dose} \times \text{média dos mortos}]}{N} \right\}$$

LD50= dose mediana 50%; LD100= menor dose necessária para matar 100%; N= número de organismos por grupo

3.3.4. Transfecção de genes repórter por eletroporação

As células, tanto HUUFS14 (*L. infantum*) quanto LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A), foram lavadas com tampão para eletroporação - EPB (pH 7,5) (Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, glucose 6 mM, pH ajustado com HCl) (Bolhassani et al., 2011; Kapler; Coburn; Beverley, 1990; Potter, 1988). As células foram centrifugadas a 1000 rcf por 5 min em centrífuga à 4°C lavadas uma vez com 1mL de tampão EPB e para a transfecção foram usadas 1x10⁷ promastigotas ressuspendidas em 400uL de tampão EPB e submetidas ao choque em aparelho eletroporador (Bio-rad Gene Pulser Xcell). Para a cepa LVH60a_C1, foram aplicados 80 µg do DNA episomal pSSU_EGFP-C1/Neo diretamente nas cubetas de 2 milímetros (mm) (Bio-Rad Laboratories). Em outro procedimento foi usado 41,5 µg do DNA linearizado de pSSU_EGFP-C1/Neo, que foi anteriormente digerido com enzimas de restrição de dupla digestão, PacI e PmeI (New England Biolabs), conforme o protocolo do fabricante. O material digerido foi aplicado em gel agarose (2%) e submetido a corrida de 80V (volts) por 50 minutos para a visualização do fragmento de pSSU_EGFP-C1/ Neo e purificado conforme especificado o kit apropriado para gel, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

A cepa HUUFS14 foi usada na eletroporação com 1×10^7 promastigotas em 400 μ L de tampão EPB e submetidas ao choque em aparelho eletroporador (Bio-rad Gene Pulser Xcell). Foi usado uma quantidade de 37,8 μ g do DNA epissomal de pSSU_mCherry-C1/Neo diretamente nas cubetas de 2 milímetros (mm) (Bio-Rad Laboratories). Após a eletroporação as cubetas foram incubadas em gelo durante 10 minutos, e depois o conteúdo passado para frascos cultivo celular com meio Schneider completo (20% SBF) sem a antibiótico G418 (análogo de neomicina) por 24 horas, após esse período foram adicionados às culturas LVH60a_C1 GFP 1x DL₅₀ de G418 e na HUUFS14 mCherry o inicial de 100 μ g/ mL de G418. As condições de eletroporação usadas estão apresentadas na tabela 5. Todas as células eletroporadas foram submetidas à pressão seletiva com a antibiótico G418.

Tabela 5: Parâmetros usados na eletroporação para a transfecção dos genes repórter.

Amostra	Tipo de DNA	Voltage m V/cm	Capacitância (μ F)	Time Constant t (ms)	Pulso e resistência	Referência de protocolo
HUUFS14	pSSU_ mCherry- C1/Neo Epissomal	450	500	4,6	único pulso e resistência	<i>L.infantum</i> (Bolhassani et al., 2011)
	Controle (sem DNA)			4,4	∞	
LVH60a_C 1 (choque 1)	pSSU__EGFP -C1/ Neo Epissomal	475	800	6	único pulso e	C. <i>fasciculata</i> (DiMaio et al., 2018)
	pSSU__EGFP -C1/ Neo Linear			6	resistência	
	Controle (sem DNA)			6	∞	
LVH60a_C 1 (choque 2)	pSSU__EGFP -C1/ Neo Epissomal	500	500	4	único pulso e	<i>C.fasciculata</i> (Pasion et al., 1994)
	pSSU__EGFP -C1/ Neo Linear			3,8	resistência	
	Controle (sem DNA)			5	∞	

3.3.5. Caracterização da linhagem de *L. infantum* expressando proteína vermelho fluorescente (HUUFS14_ pSSU_ mCherry-C1/Neo)

A verificação do padrão de crescimento *in vitro* das células foram feitas com as cepas selvagens (*wild type* – WT) não transfectadas e a linhagem transfectada foram avaliados por meio da curva de crescimento no período de 8 dias. A curva de crescimento foi construída começando com uma densidade de 2×10^5 parasitas/ mL, em placas de 12 poços feita em triplicata e incubadas à uma temperatura de 27°C. A contagem foi feita câmara de Neubauer conduzida por meio de uma diluição de 1:100 das amostras em PBS 1X (2% de formaldeído). Em seguida, foram colocados 10 µL dessa diluição na câmara obtidas através da fórmula: $(Q1+Q2+Q3+Q4) / 4 \times 10^2 \times 10^4$ e os dados foram analisados com teste estatístico Two-Way ANOVA.

As células THP-1 foram distribuídas em placas com 24 poços tanto com lamínulas redondas de 10 mm, na concentração de 5×10^5 células/ mL, para a posterior infecção realizar a coloração com o método Romanowsky com o kit Panótico Rápido (LarboClin) e visualização microscópica. Além disso também foram semeados em placas de 12 poços sem lamínulas na concentração de 1×10^6 células/ mL para a extração de DNA e aplicação em PCR em tempo real (qPCR). Para ambas as situações as THP-1 foram tratadas com 0,1µM de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Sigma-Aldrich) incubadas durante 48 horas à 37 °C, 5% de CO₂ para induzir a diferenciação para macrófagos aderentes.

A quantificação microscópica e avaliação dos macrófagos infectados foi realizada de forma manual visualizada por microscópio óptico de luz na objetiva de 100X (Olympus). Os gráficos da estimativa da carga parasitária foram gerados no programa GraphPad Prism 5. Para a quantificação da carga parasitária em qPCR, o DNA genômico foi extraído com o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega) conforme descrito item 3.1.3.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Performance dos primers e validação dos alvos para qPCR

O *primer* para qPCR LinJ31_2420 que amplifica um produto de 98 bp e o *primer* para PCR LinJ31seq amplifica um produto de 444 bp foram projetados com base nas sequências do gene LinJ31_2420 ([XM_001467522.1](#)) utilizando as ferramentas disponíveis no banco de dados TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010). Na primeira versão do genoma publicado em 2011 de Rogers e colaboradores (Rogers *et al.*, 2011) esse gene putativo da p-nitrofenilfosfatase era exclusivo de *L. infantum*. Entretanto, por meio de reanálises e atualizações dos genomas de outras espécies de *Leishmania* nos bancos de dados, ortólogos desse gene também foram identificados em outras espécies de *Leishmania*, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Informações de ID do gene, cromossomo, número de cópias do gene putativo da p-nitrofenilfosfatase em *Leishmania* spp.

Espécies	Código do Gene	Descrição do Gene	Chr.	Número de cópias
<i>L. infantum</i> (JPCM5)	LinJ31_2420	p-nitrophenylphosphatase - putative	31	1
<i>L. donovani</i> (BPK282A1)	LdBPK_312410.1	p-nitrophenylphosphatase - putative	31	1
<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)	LbrM.31.2620	p-nitrophenylphosphatase - putative	31	2
<i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR/71973/M2269)	LAMA_00064530 0	Haloacid dehalogenase-like hydrolase/ HAD-hydrolase-like/ Mitochondrial PGP phosphatase, putative	Not Assigned	1

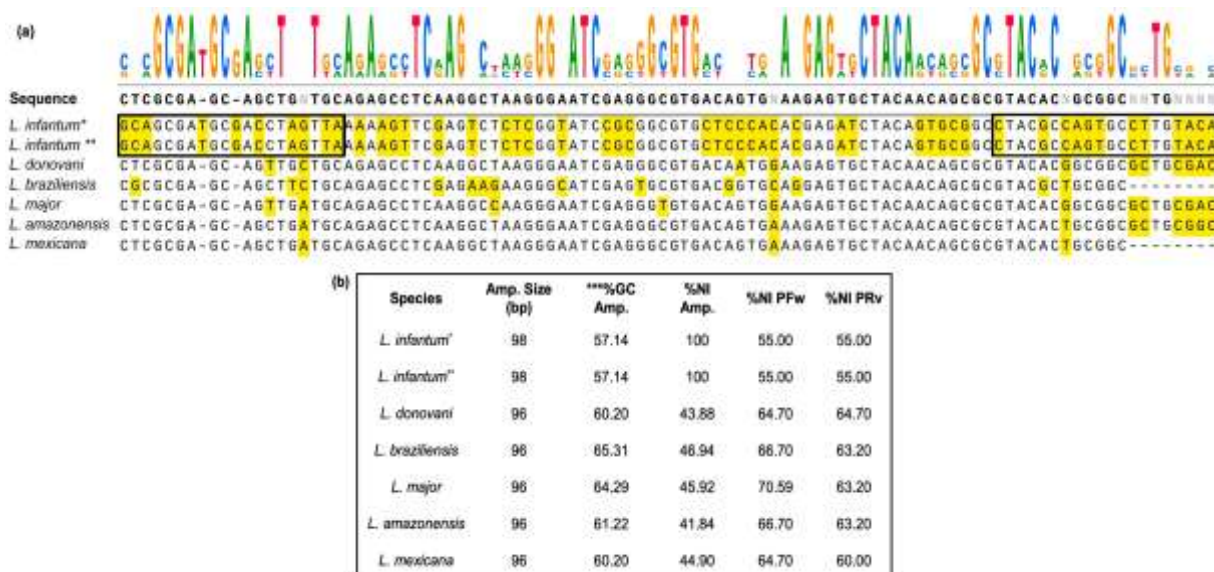
<i>L. mexicana</i> (MHOM/GT/20 01/U1103)	LmxM.30.2340	p- nitrophenylphosphatas e - putative	30	1
<i>L. major</i> (Friedlin)	LmjF.31.2340	p- nitrophenylphosphatas e - putative	31	1

Chr= cromossomo. Tabela adaptada do trabalho de (Takamiya et al., 2023)

O gene LinJ31_2420 corresponde ao gene putativo da p-nitrofenilfosfatase, um gene de cópia única identificado no cromossomo 31 da cepa de referência JPCM5 (*L. infantum*). Foi identificado por meio da reanálise de genes de cópia única em *Leishmania*, conforme detalhado no estudo de Rogers *et al.* (Rogers *et al.*, 2011).

Por meio das análises de alinhamento das sequências do *primer* LinJ31_2420 (qPCR) a cepa do genoma de referência JPCM5 e a cepa HUUFS14 (*L. infantum* usada no laboratório) apresentam 100% de identidade nucleotídica para o gene putativo da p-nitrofenilfosfatase ([XM_001467522.1](#)); diferentemente do observado no alinhamento para outras espécies de *Leishmania* com porcentagem de identidade nucleotídica inferiores à 50%, além de apresentar diferenças no conteúdo GC (guanidina e citosina) e de *gaps* na região de anelamento dos *primers*, como mostra a Figura 8.

Figura 8: Alinhamento de sequência da região alvo (98 pb) do *primer* LinJ31_2420 em parasitas *Leishmania*.

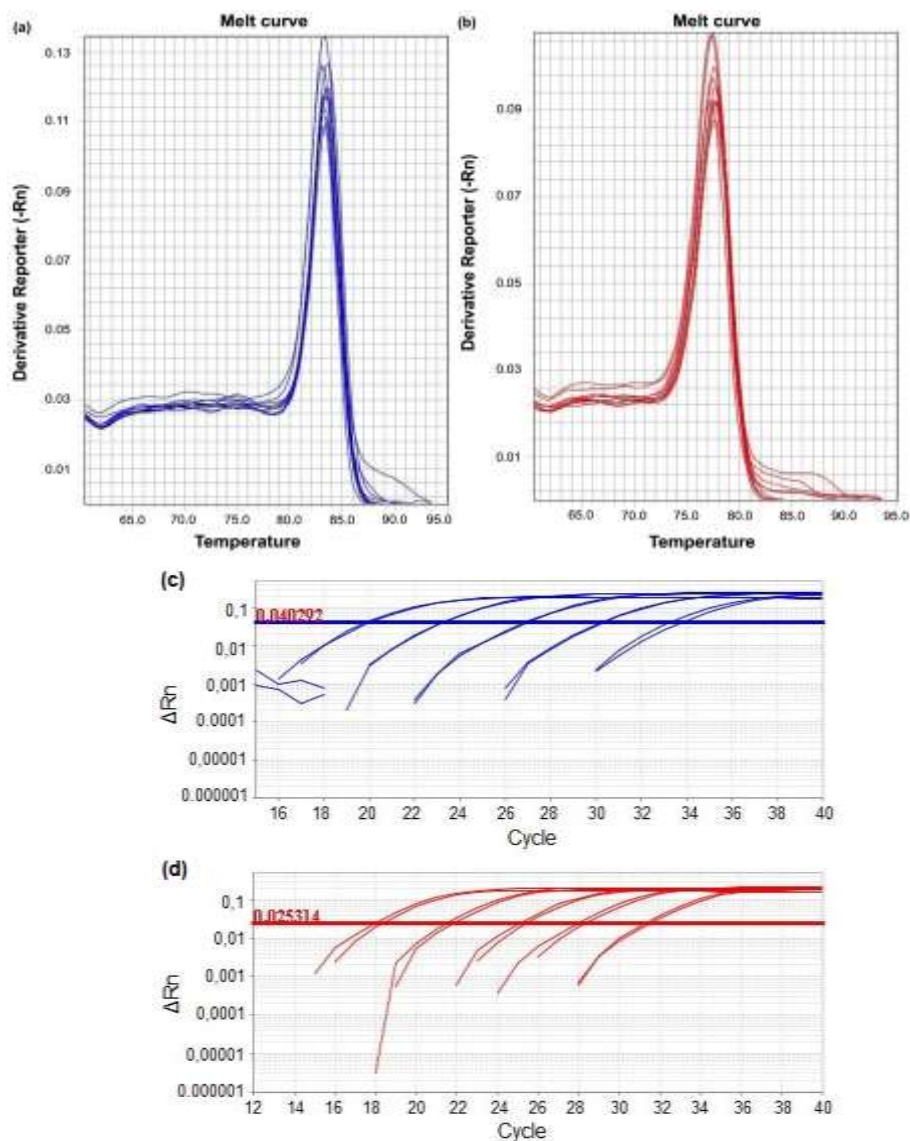


(a) *Amplicon* (98 bp) do gene LinJ31_2420 na cepa JPCM5* e HUUFS14** (*L. infantum*) da região de alinhamento dos *primer* LinJ31_2420 e comparação com as demais espécies de *Leishmania*. As posições nas extremidades 5' e 3' onde ocorre o pareamento do *primer* são delimitadas pelas caixas em cor preta. Acima do

alinhamento múltiplo o esquema de cores das letras representa as bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanidina (G) e timina (T). As bases nitrogenadas apresentadas pelo tamanho da letra (alto) refletem a similaridade observada em todas as espécies de *Leishmania* e aquelas com duas letras (baixo) referem-se a trocas de bases nitrogenadas. (b) Box resume as principais características da sequência alvo do primer LinJ31_2420 em *L. infantum* e outras espécies de *Leishmania*. Os asteriscos indicam: * JPCM5, o genoma de referência de *L. infantum* (Montagem do genoma ASM287v2) e ** HUUF14, o genoma da cepa de laboratório (Montagem do genoma HUUF14) usado para experimentos. *L. donovani* (número de acesso: LdBPK 312410.1), *L. braziliensis* (número de acesso: LbrM. 31.2620), *L. panamensis* (número de acesso: LPAL13 310028600) e *L. major* (número de acesso: LmjF. 31.2340); *L. amazonensis* (número de acesso: LAMA 000645300) e *L. mexicana* (número de acesso: LmxM. 30.2340). Amp: amplicon; NI: porcentagem de identidade de nucleotídeos; *** porcentagem de guanidina (%G) e citosina (%C); iniciador direto (PFw); iniciador reverso (PRv); pb: par de bases. O alinhamento foi gerado e formatado utilizando o software SnapGene® versão 7.0. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

A validação técnica dos ensaios de qPCR foram feitas com o *primer* LinJ31_2420 desenhado neste estudo e comparados com outro *primer* descrito na literatura, o LinJ31_L42486.1 (Chowdhury *et al.*, 2020; Ghosh *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2019; Vallur *et al.*, 2014). Através do desempenho da curva de dissociação foi possível averiguar a especificidade dos *primers* com DNA de HUUF14 (*L. infantum*) para ambos os *primers*, com picos únicos e valores de temperatura de *melting* (T_m) de 83,35°C para LinJ31_2420 e T_m de 77,56°C para o *primer* LinJ31_L42486.1, como mostra a Figura 9. A construção da curva padrão usando o cálculo da massa de DNA de um parasita *L. infantum* com seis pontos também estão apresentados na Figura 8. Não houve amplificação com o DNA de *L. amazonensis* (M2269), *L. braziliensis* (M2904), *Crithidia sp* LVH60A (LVH120_C5), *C. fasciculata* (TCC039E), *T. cruzi* (cepa Y) e nos hospedeiros vertebrados (humano, cão, gato e camundongo).

Figura 9: Curva de dissociação e gráfico de amplificações usando os *primers* LinJ31_2420 e LinJ31_L42486.1.



(a) curva de dissociação para os *primers* LinJ31_2420 exibiu uma T_m média de 83,35°C. (b) Os *primers* LinJ31_L42486.1 apresentaram uma curva de dissociação com T_m médio de 77,56°C. (c) Gráfico de amplificações com LinJ31_2420 utilizaram diluições seriadas de DNA de *L. infantum* (cepa HUUFS14) variando de $40,7e-09$ g/ μ L a $40,7e-15$ g/ μ L equivalente aos seis pontos da curva padrão. (d) A mesma abordagem foi aplicada para o *primer* LinJ31_L42486.1. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Para a detecção molecular de espécies relacionadas a *Crithidia* sp. foi padronizado com o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F. Esses *primers* foram desenhados para amplificar um produto de 107 bp do gene da enzima catalase, que foi identificado através das análises do genoma de *Crithidia* sp. (LVH60a_C1) (Maruyama *et al.*, 2019), como mostrado na Tabela 7.

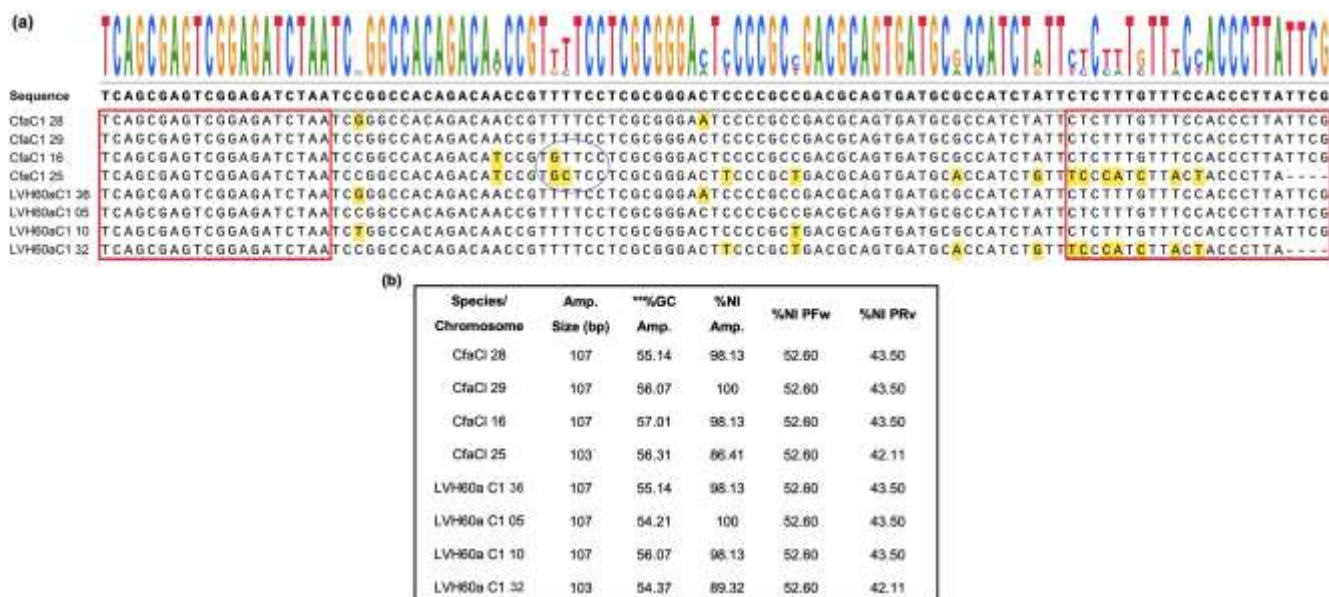
Tabela 7: Informações de ID do gene, cromossomo, número de cópias do gene Catalase em *Crithidia* sp LVH-60A, *C. fasciculata* e *Leptomonas* spp.

Espécie	Código do gene	Produto	Chr.	Número de cópias
<i>Crithidia fasciculata</i> (CfCI)	CFAC1_25000620 0	Catalase/Catalase -related immune- responsive, putative	25	4
	CFAC1_28000660 0		28	
	CFAC1_29000550 0		29	
	CFAC1_16003140 0		16	
<i>Crithidia</i> sp LVH- 60A (LVH60a_C1)	CP119667.1	Catalase - putative	10	4
	CP119668.1		36	
	CP119663.1		5	
	CP119644.1		32	
<i>Leptomonas pyrrocoris</i> (H10)	LpyrH10_15_0020	Catalase	15	1
<i>Leptomonas seymouri</i> (ATCC_30220)	Lsey_0026_0490	Catalase	Not Assigned	1

Chr= cromossomo. Tabela adaptada do trabalho de (Takamiya et al., 2023)

Na análise do *amplicon* de Catalase_LVH60-12060_1F (107 bp) nas sequências do genoma de *C. fasciculata* (cepa de referência CfCI) e de *Crithidia* sp. LVH60A (LVH60a_C1) foi observado quatro cópias em diferentes cromossomos. Também foi possível observar regiões onde ocorrem as trocas de nucleotídeos, refletindo os polimorfismos vistos em dois cromossomos de *C. fasciculata*, como mostra a Figura 10.

Figura 10: Alinhamento de sequência da região alvo (107 pb) do *primer* Catalase_LVH60-12060_1F em parasitas *Crithidia*.

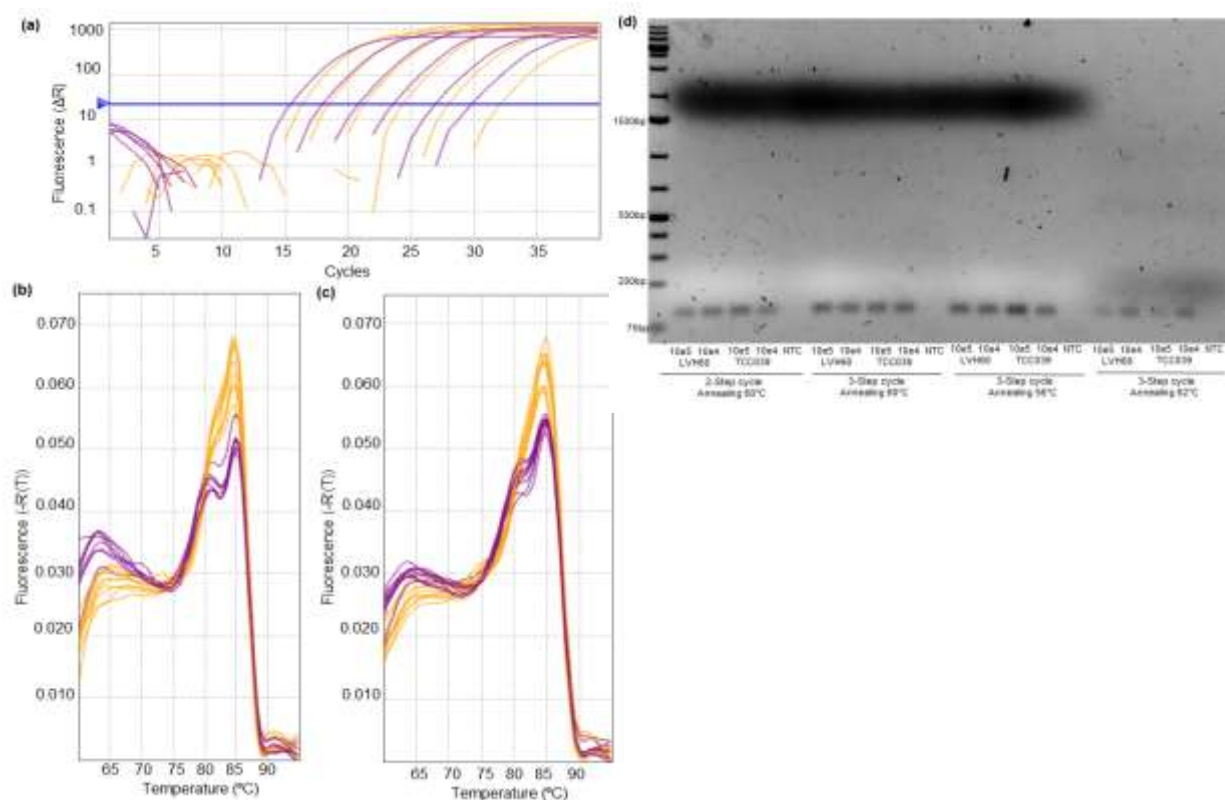


(a) Região de 107 pb no gene Catalase putativo onde as sequências de alinhamento do *primer* Catalase_LVH60-12060_1F ocorrem em LVH60a_C1 (*Crithidia sp* LVH60A) e *C. fasciculata* (CfCI). As posições nas extremidades 5' e 3' onde ocorre o pareamento do *primer* são delimitadas pelas caixas de cor vermelho. Acima do alinhamento múltiplo do *primer* Catalase_LVH60-12060_1F com *Crithidia sp* LVH60A (LVH60a_C1) e *C. fasciculata* (CfaCI), o esquema de cores das letras representa as bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanidina (G) e timina (T). As bases nitrogenadas apresentadas pelo tamanho da letra (grande) refletem a semelhança observada nos cromossomos *Crithidia* e aquelas com duas letras (menor) referem-se a trocas de bases nitrogenadas. O círculo azul indica as regiões de polimorfismo encontrado nos cromossomos de *C. fasciculata*. (b) A caixa resume as principais características da sequência alvo do *primer* Catalase_LVH60-12060_1F nos parasitas *Crithidia*. Quatro cópias do gene nessas espécies foram observadas no cromossomo de *C. fasciculata* (CfaCI 28 CFAC1_280006600, CfaCI 29 CFAC1_290005500, CfaCI 16 CFAC1_160031400 e CfaCI 25 CFAC1_250006200) e sequências de regiões do genoma do LVH60A_C1 (Chromo cerca de 36, cromossomo 05, Cromossomo 10 e Cromossomo 32 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_030078075.1; acessado em 22 de outubro de 2022). *Amplicon* (amp.); porcentagem de identidade de nucleotídeos (%NI); ** porcentagem de guanidina (%G) e citosina (%C); *primer forward* (PFW); *primer reverso* (PRv); par de bases (pb). O alinhamento foi gerado e formatado usando o software SnapGene® versão 7.0 (Insightful Science). Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

A validação técnica com o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F foi DNA de *Crithidia sp* LVH60A (cepa LVH60_C1) e *C. fasciculata* (cepa TCC039E) está apresentada na figura 11. A curva de dissociação para ambos os parasitas indicou serem semelhantes com uma Tm média de 84,79°C para LVH60_C1 e Tm média 85,00°C para *C. fasciculata* TCC039E, para esta última foi perceptível a presença de um pico discreto em torno de 81°C. Os produtos dessas qPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) para visualizar o tamanho das bandas únicas amplificadas e descartar a presença de *amplicons* inespecíficos,

a qual nos revelou produtos únicos (Figura 11d). Além da análise do gel de agarose, para fortalecer ainda mais a evidência de que o pico adicional se deve a fatores específicos da sequência, utilizamos o *software* de previsão de curva de dissociação uMelt (<https://dna-utah.org/umelt/quartz/>) usando amplicon de Catalase. Foi previsto que os três *amplicons* (107 pb) de *Crithidia* sp LVH60A exibissem um pico principal único a 86,5°C e um pico secundário na faixa de 81°C a 81,5°C. Foi observado que os três *amplicons* (107 pb) de *C. fasciculata* apresentam um pico principal único na faixa de 86°C a 87,5°C e um pico secundário a 81°C, como apresentado na Figura no Apêndice 2. A partir desses resultados, analisamos que a configuração do ciclo universal foi a mais apropriada com precisão para detectar tanto *Crithidia* sp LVH60A quanto *C. fasciculata*.

Figura 11: Resultado do ensaio de qPCR com par de *primers* Catalase_LVH60-12060_1F.

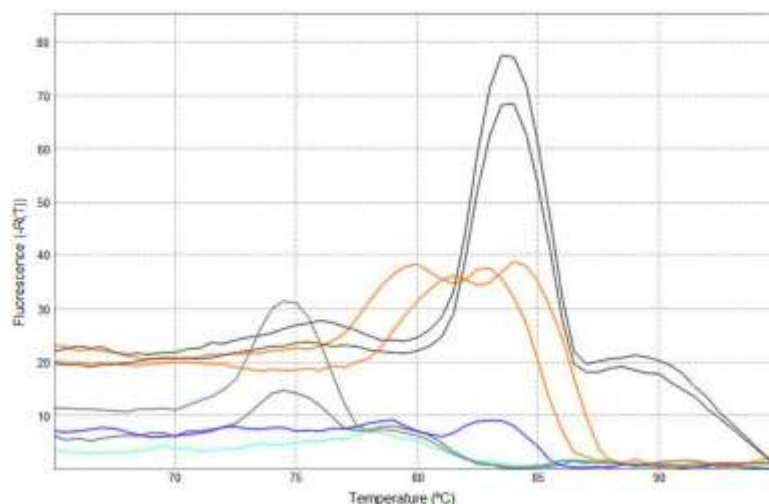


(a) Gráfico de amplificação da curva padrão de seis pontos com *primer* Catalase_LVH60-12060_1F usado diluições seriadas de 10 vezes de DNA genômico da cepa LVH60_C1 (*Crithidia* sp LVH60A) variando de 43,6 e-9 g a 43,6 e-15 g (em amarelo) e DNA da cepa TCC039E (*C. fasciculata*) variando de 52,4 e-9 g a 52,4 e-15 g (em roxo); (b) As curvas de dissociação com o molde de DNA da cepa LVH60_C1 *Crithidia* sp LVH60A (curvas amarelas) mostraram um T_m médio de 84,79°C, enquanto as reações usando o molde de DNA da cepa TCC039E *C. fasciculata* (curvas roxas) mostraram um T_m médio de 85,00°C com anelamento de 2 etapas à 60°C. (c) Curva de dissociação com anelamento de 3 etapas a 60°C, modelo de DNA da cepa LVH60_C3 *Crithidia* sp LVH60A

(curvas amarelas) mostrou um T_m médio de 84,71°C, enquanto as reações usando o modelo de DNA da cepa TCC039E *C. fasciculata* (curvas roxas) apresentaram uma T_m média de 85,00°C. (d) A eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para analisar as amplificações do par de *primers* Catalase LVH60-12060_1F. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Estes *primers* não apresentaram amplificação para o DNA de *L. infantum* (cepa HUUF14), *T. cruzi* (cepa Y) ou DNA hospedeiro (humano), ou seja, no experimento realizado foi específico para o DNA de *Crithidia* sp. LVH60A (isolado LVH60_C1) (Figura 12).

Figura 12: Especificidade do *primer* Catalase_LVH60-12060_1F.



Curva de dissociação com LVH60_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) (curva preta) atingindo T_m de 84,50°C. Não indicando especificidade com material de DNA humano (curva laranja), cepa HUUF14 (*L. infantum*) (curva cinza) e *T. cruzi* (cepa Y) (curva azul). Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

O alvo desenhado para *Crithidia* sp. com base no gene catalase (*primer* Catalase_LVH60-12060_1F) mostrou-se específico para *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata* não amplificando para o DNA de *Leishmania* e hospedeiros vertebrados.

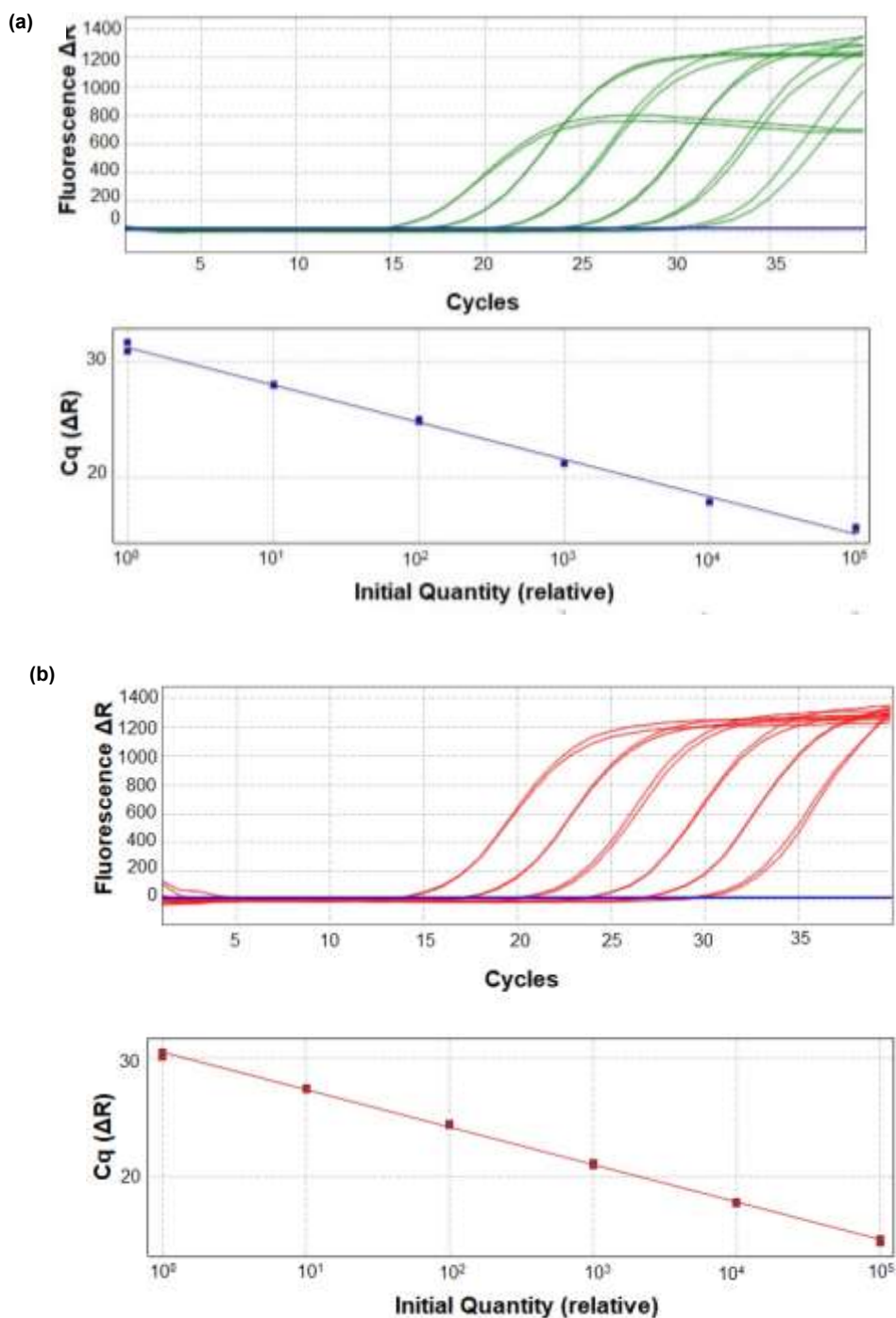
4.1.1. Construção da curva padrão e ensaio de reprodutibilidade e repetibilidade

Com o cálculo utilizando a massa de DNA de um parasita, realizada com base no tamanho do genoma de *L. infantum* e *Crithidia* sp. (apresentado na Tabela 3 no item de Material e Métodos), a curva padrão foi construída com seis pontos em diluição seriada na ordem de 10x variando de 10^5 a 10^0 parasitas. Adicionalmente a cada ponto, uma quantidade de DNA (6ng/ reação) de hospedeiro vertebrado (humano ou cão ou gato ou camundongo) foi inserido como um *background* simulando uma amostra de hospedeiro infectado.

A curva padrão utilizando o *primer* LinJ31_2420 foi gerada por meio do cálculo da massa de DNA do HUUF14 (*L. infantum*) com diluições seriadas variando de 40,7e-09 g/ μ L

a $40,7\text{e-}15$ g/ μL , como ilustrado na Figura 13a. Similarmente, a curva padrão para o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F foi construída com base no cálculo da massa de DNA do LVH60_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A), utilizando diluições seriadas variando de $43,6\text{e-}09$ g/ μL a $43,6\text{e-}15$ g/ μL , conforme representado na Figura 13b.

Figura 13: Curva padrão dos ensaios de qPCR construída com a massa de DNA de cada espécie de parasita (*L. infantum* e *Crithidia*) e os respectivos *primers*, Linj31_2420 ou Catalase_LVH60-12060_1F



(a) Gráfico de amplificação da curva padrão com DNA de *L. infantum* (HUUFS14) usando *primer* LinJ31_2420, cada ponto de cor azul na linha representa o equivalente de 1×10^5 parasitas a 10^0 parasitas. Curva construída a partir do cálculo da massa equivalente de um parasito juntamente com o DNA do hospedeiro não infectado por tripanossomatídeos [6ng] como fundo fixo da reação. (b) Gráfico de amplificação da curva padrão e curva padrão com DNA de *Crtithidia* sp LVH60A (LVH60_C1) usando *primer* Catalase_LVH60-12060_1F, cada ponto de cor vermelha na linha representa o equivalente de 1×10^5 parasitas a 10^0 parasitas. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Ensaio de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados com ambos os *primers* em instrumentos de qPCR de marcas diferentes, a fim de avaliar a variação técnica. A especificidade dos *primers* em detectar o material do parasita foi avaliada em um contexto de fundo de DNA fixo de cada hospedeiro vertebrado (humano, cão, gato e camundongo). As reações da curva padrão apresentaram coeficientes favoráveis em ambos os instrumentos de marcas distintas, como observado pelos valores de coeficientes de determinação de eficiência (Eff) da Tabela 8. Os valores de coeficiente (R^2) com os *primers* LinJ31_2420 foi de 0,95 e para Catalase_LVH60-12060_1F foi de 0,99.

Tabela 8: Valores de coeficiente das curvas padrão de qPCR usando DNA hospedeiro como pano de fundo nas reações.

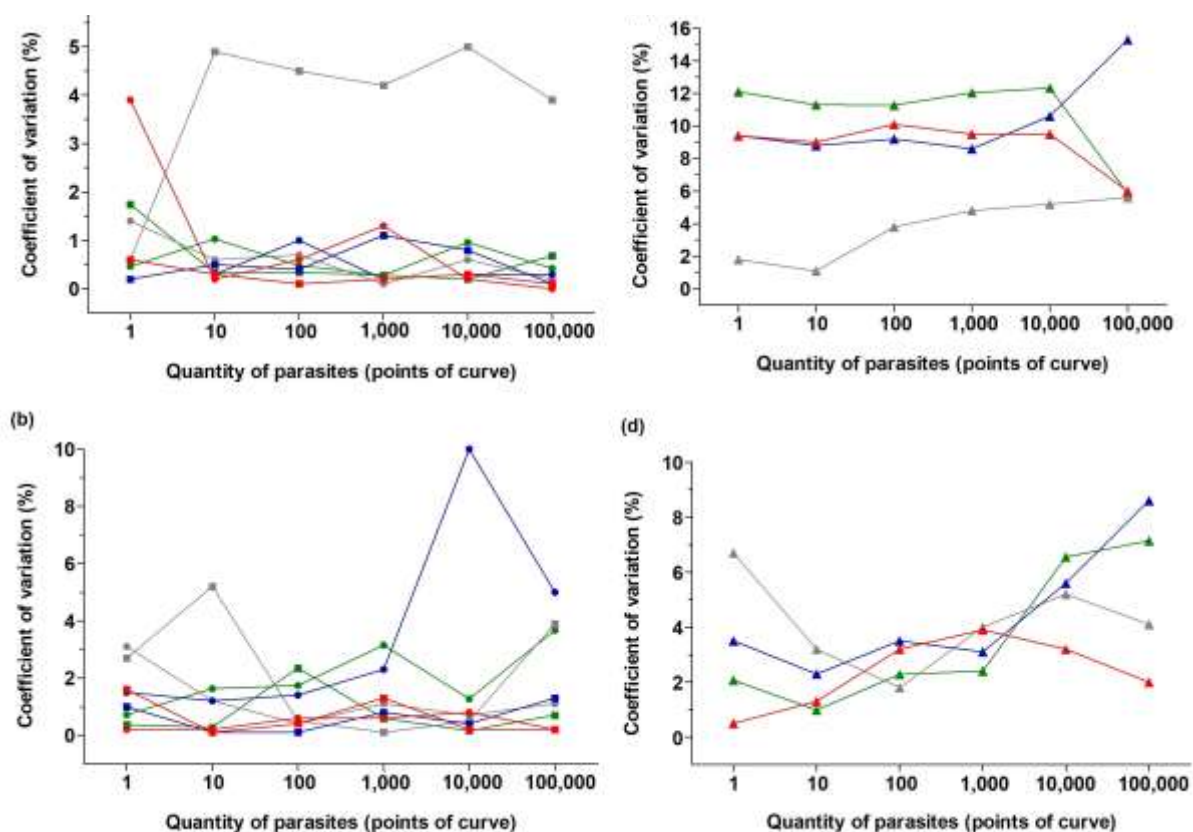
Primer	Source of DNA background	Slope	R²*	Eff%**	
LinJ31_2420	DNA Human	-3.77	0.949	111.65	
	7500 Fast Dx Real Time PCR Machine (Thermo Fisher Scientific)	DNA Dog	-3.53	0.945	113.85
		DNA Cat	-3.12	0.988	108.80
		DNA J774	-3.82	0.952	114.88
	DNA Human	-3.22	0.997	104.26	
AriaMx Real- Time PCR System(Agilent)	DNA Dog	-3.35	0.971	114.50	
	DNA Cat	-3.35	0.998	98.46	
	DNA J774	-3.29	0.999	101.29	
Primer	Source of DNA background	Slope	R²*	Eff%**	
Catalase_LVH60-12060_1F	DNA Human	-3.16	0.953	107.13	
	7500 Fast Dx Real Time PCR Machine (Thermo Fisher Scientific)	DNA Dog	-3.02	0.945	113.85
		DNA Cat	-3.47	0.981	94.10
		DNA J774	-3.01	0.952	114.88
	DNA Human	-3.28	0.993	101.62	
AriaMx Real- Time	DNA Dog	-3.05	0.978	112.88	

PCR System(Agilent)	DNA Cat	-3.51	0.977	119.23
	DNA J774	-3.30	0.998	100.76

*coeficiente de determinação; ** porcentagem de eficiência da reação. Tabela reproduzida do trabalho de (Takamiya et al., 2023).

Utilizando o coeficiente de variação (CV) nos ensaios de repetibilidade, avaliamos a consistência dos resultados ao repetir a mesma técnica várias vezes, sob as mesmas condições e utilizando o mesmo aparelho de qPCR. Ensaios de reprodutibilidade também foram conduzidos, envolvendo a aplicação do mesmo protocolo experimental, porém utilizando outro equipamento de qPCR para avaliação da robustez e a confiabilidade dos dados obtidos. A repetibilidade das reações usando *primer* LinJ31_2420 indicou um CV muito baixo (por volta de 1,5%) usando DNA de cão, humano e camundongo, como apresentado na Figura 14a. As reações com DNA de gato apresentaram uma variação um pouco maior (CV ~5%). Para o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F, a CV foi um pouco maior (~2,0%) como mostra a Figura 14b. Comparações com ensaios de reprodutibilidade em instrumentos de marcas diferentes também mostraram valores de CV baixos para ambos os *primers* (Figuras 14c e 14d), evidenciando a acurácia dos *primers* para detecção de parasitas.

Figura 14: Coeficiente de variação (%) das curvas padrão qPCR intra e inter-ensaios.



(a) Repetibilidade (intravariação nos gráficos à esquerda) e reprodutibilidade (intervariação nos gráficos à direita) dos ensaios com o *primer* LinJ31_2420 (a,c) e dos ensaios com o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F (b,d), medido através do coeficiente de variação (CV%) expresso em percentagem. O CV% dos intra-ensaios foi calculado com réplicas dentro da mesma placa (instrumento 1, símbolos quadrados, ou com o instrumento 2, símbolos circulares), enquanto o CV% dos interensaios foi calculado com réplicas em placas realizadas com diferentes qPCR instrumentos (ou seja, comparação entre placas/instrumentos, símbolos triangulares). DNA da cepa M2903 (*L. braziliensis*), cepa M2269 (*L. amazonensis*), cepa Y (*T. cruzi*) e hospedeiros vertebrados não apresentaram amplificação para os *primers* LinJ31_2420 e Catalase_LVH60-12060_1F. A amplificação não foi observada na reação controle. Foram utilizados genes endógenos de controle de retrovírus endógenos do grupo 3 (ERV-3) para humanos e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH) para outros hospedeiros vertebrados. DNA de hospedeiros vertebrados foi usado como fundo fixo (6 ng) em todos os pontos da curva qPCR (cor verde DNA humano, em cor cinza o DNA de gato, em cor azul o DNA de cachorro e em cor vermelho o DNA de camundongo). Os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

4.1.2. Ensaio *spike-in* com *primers* LinJ31_2420 e Catalase_LVH60-12060_1F

A fim de validar a precisão de cada par de *primers* na detecção da espécie-alvo em reações de qPCR, experimentos de *spike-in* com DNA de tripanossomatídeos de espécies diferentes foram realizados. Nesses experimentos, simulamos um cenário de coinfeção entre os parasitas *L. infantum* e *Crithidia* sp. LVH60A. Para isso, misturamos proporções conhecidas de DNA desses protozoários junto com DNA de diferentes espécies hospedeiras (humano, cão, gato ou camundongo).

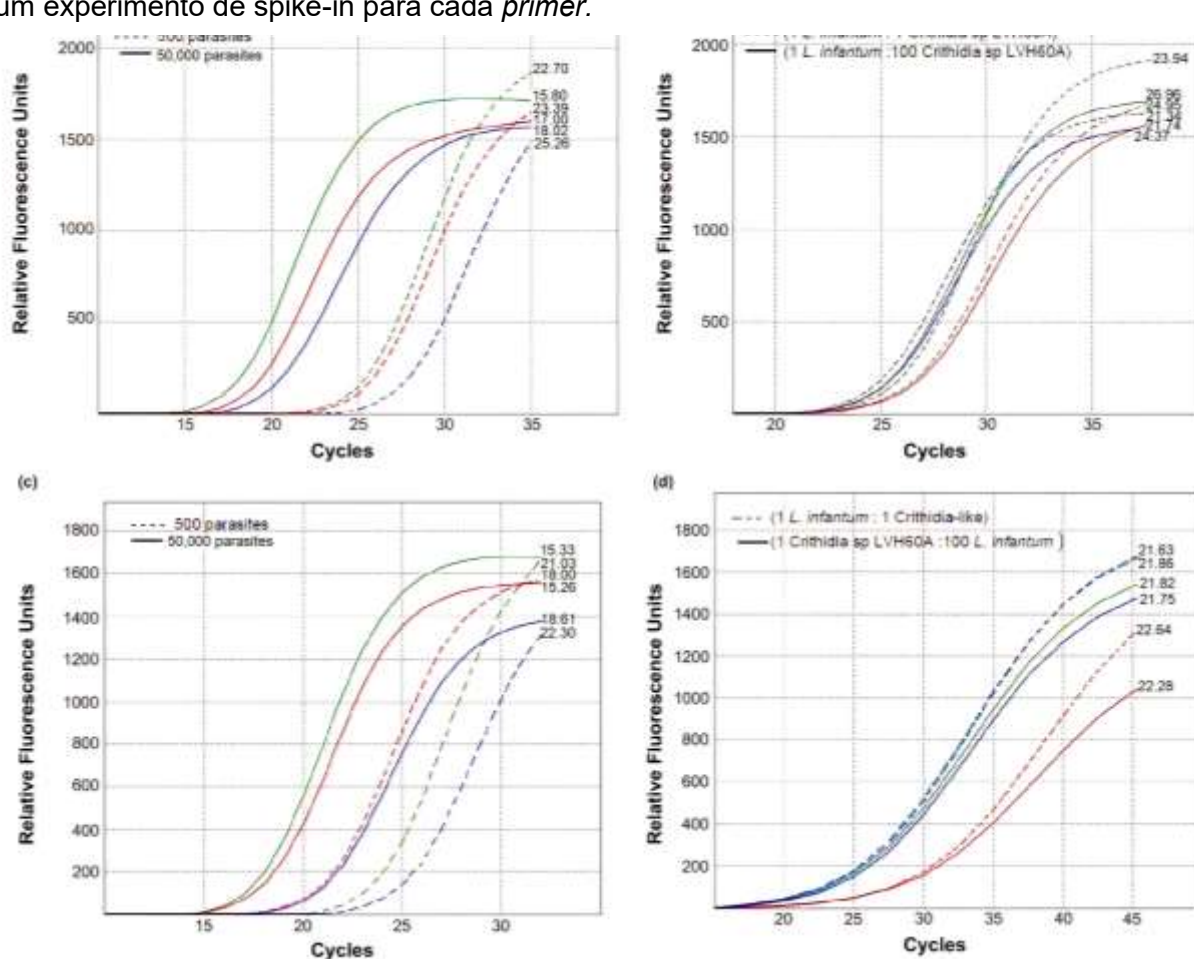
Primeiramente, ensaios com DNA de cada parasita foi testado isoladamente. A quantidade de DNA equivalente a 5×10^2 e 5×10^4 de parasitas foi calculada usando DNA de HUUF14 (*L. infantum*) e DNA de LVH60_C3 (*Crithidia* sp. LVH60A). Os valores de Cq observados para o *primer* Linj31_2420, quando utilizando DNA de *L. infantum* puro, estavam dentro da faixa esperada para uma diluição seriada de 10 vezes. Conforme apresentado na Figura 15a, a diferença nos valores de Cq das amostras indica a variação de Cq (ΔCq) entre as reações contendo 5×10^4 (Cq ~17) e 5×10^2 (Cq ~24) equivalentes de parasitas foi de aproximadamente 6,8 ciclos. Da mesma forma foram observados os valores esperados no ensaio conduzido com *primer* Catalase_LVH60-12060_1F usando o DNA puro de LVH60_C1 (Figura 15c), apenas com o DNA de cão e de camundongo usado como fundo foi visto uma ΔCq de ~3,2 ciclos ao invés de ~6,4 ciclos.

Em seguida, a mistura com quantidades conhecidas de DNA dos diferentes parasitas foi conduzida. Foi adicionado DNA de LVH60_C1 junto ao DNA de HUUF14 para detectar *L. infantum* com *primer* LinJ31_2420 nas proporções 1:1 (5×10^2 *L. infantum*: 5×10^2 *Crithidia* sp LVH60) e de 1:100 (5×10^2 *L. infantum*: 5×10^4 *Crithidia* sp LVH60). De forma semelhante, as proporções de DNA dos parasitos foram preparadas para avaliar o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F: proporção 1:1 (5×10^2 *Crithidia* sp LVH60A: 5×10^2 *L. infantum*) e

1:100 (5×10^2 *Crithidia* sp LVH60A: 5×10^4 de *L. infantum*). Ambos os *primers* demonstraram ser específicos com baixa inibição na presença do DNA de outra espécie de tripanossomatídeo, independente das quantidades utilizadas, como indica a Figura 15b e 15d.

Para garantir a integridade do DNA de cada hospedeiro dentro das reações *spike-in*, a qPCR foi realizada usando o *primer* ERV-3 (Adui et al., 2006; Chin Yuan; Miley; Waters, 2001) para DNA humano (6 ng/ reação) resultando em um Cq médio de $27,48 \pm 0,41$. Para DNA de cão e camundongo (6 ng/ reação), o *primer* G3PDH (Barker et al., 2010; Reis et al., 2013) foi empregado, produzindo valores médios de Cq de $17,67 \pm 0,66$ e $21,56 \pm 0,44$, respectivamente.

Figura 15: Precisão dos ensaios qPCR na quantificação de parasitas avaliada através de um experimento de spike-in para cada *primer*.



(a) Quantificação do DNA de *L. infantum* com o *primer* LinJ31_2420 usando quantidades conhecidas em número equivalente de parasitas (500 parasitas, curvas em linhas tracejadas; 50.000 parasitas, curvas em

linhas sólidas). Os números nas curvas indicam os valores limiares de Cq para quantificação de *L. infantum*. (b) Quantificação de DNA de *L. infantum* com o *primer* LinJ31_2420 em um experimento *spike-in* usando DNA de *Crithidia* sp. LVH60A (cepa LVH60_C3) em duas proporções: 500 parasitas *L. infantum*:500 parasitas *Crithidia* sp. LVH60A (1:1, curvas em linhas tracejadas); e 500 parasitas *L. infantum*: 50.000 parasitas *Crithidia* sp. LVH60A (1:100, curvas em linhas sólidas). Os números nas curvas indicam os valores limiares de Cq para quantificação de *L. infantum*. (c) Quantificação de *Crithidia* sp. DNA LVH60A com o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F usando quantidades conhecidas em número equivalente de parasitas (500 parasitas, curvas em linhas tracejadas; 50.000 parasitas, curvas em linhas sólidas). Os números nas curvas indicam os valores limiares de Cq para quantificação de *Crithidia* sp. LVH60A. (d) Quantificação de *Crithidia* sp. DNA LVH60A com o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F em um experimento *spike-in*, usando DNA de *L. infantum* em duas proporções: 500 parasitas *Crithidia* sp. LVH60A:500 parasitas *L. infantum* (1:1, curvas em linhas tracejadas); e 500 parasitas *Crithidia* sp. LVH60A: 50.000 parasitas *L. infantum* (1:100, curvas em linhas sólidas). Os números nas curvas indicam os valores limiares de Cq para a quantificação de *Crithidia* sp. LVH60A. O DNA (6 ng/reação) de cada hospedeiro vertebrado foi usado como fundo fixo para simular uma infecção. As curvas em cor verde, azul e vermelha representam o DNA da espécie hospedeira: humano, cão e camundongo, respectivamente. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Através deste ensaio de *spike-in*, demonstramos a precisão da detecção e a especificidade dos *primers* desenvolvidos neste estudo. Uma pequena diminuição da eficiência da reação foi observada ao usar DNA de cães e camundongos. Uma das razões pode ser atribuída à interferência causada pela quantidade de DNA do hospedeiro, possivelmente devido a erros de diluição manual ao se aplicar nos ensaios. Portanto, mostramos efetivamente que o *primer* LinJ31_2420 e o *primer* Catalase_LVH60-12060_1F são específicos para para detecção da espécie *L. infantum* e de *Crithidia* sp, respectivamente podendo serem empregados nas investigações e triagem de casos de coinfeção entre *L. infantum* e *Crithidia* sp.

4.2. Validação do novo ensaio de qPCR em condições experimentais

4.2.1. Infecção *in vitro* de THP-1 com *L. infantum*

A infecção *in vitro* de macrófagos THP-1 foi realizada em diferentes tempos (24 horas, 48h e 72h) e a quantificação da carga parasitária pós-infecção foi avaliada por meio de contagem visual por microscopia (Figura 16a- f) e por qPCR usando os *primers* LinJ31_2420 e LinJ31_L42486.1 (Chowdhury *et al.*, 2020; Ghosh *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2019; Vallur *et al.*, 2014) (Figura 17a) para infecções com *L. infantum*, bem como o *primer* Catalase_LVH60_12060_1F (Figura 17b) para infecções com *Crithidia* sp. Reações contendo 12 ng de DNA de amostra de THP-1 infectadas, quando submetidas ao *primer* ERV-3 foram capazes de detectar exclusivamente DNA de macrófagos, resultando em um valor médio de Cq de $26 \pm 0,05$. Esse resultado indicou que o material genético manteve sua integridade e qualidade ao longo do processo de extração de DNA.

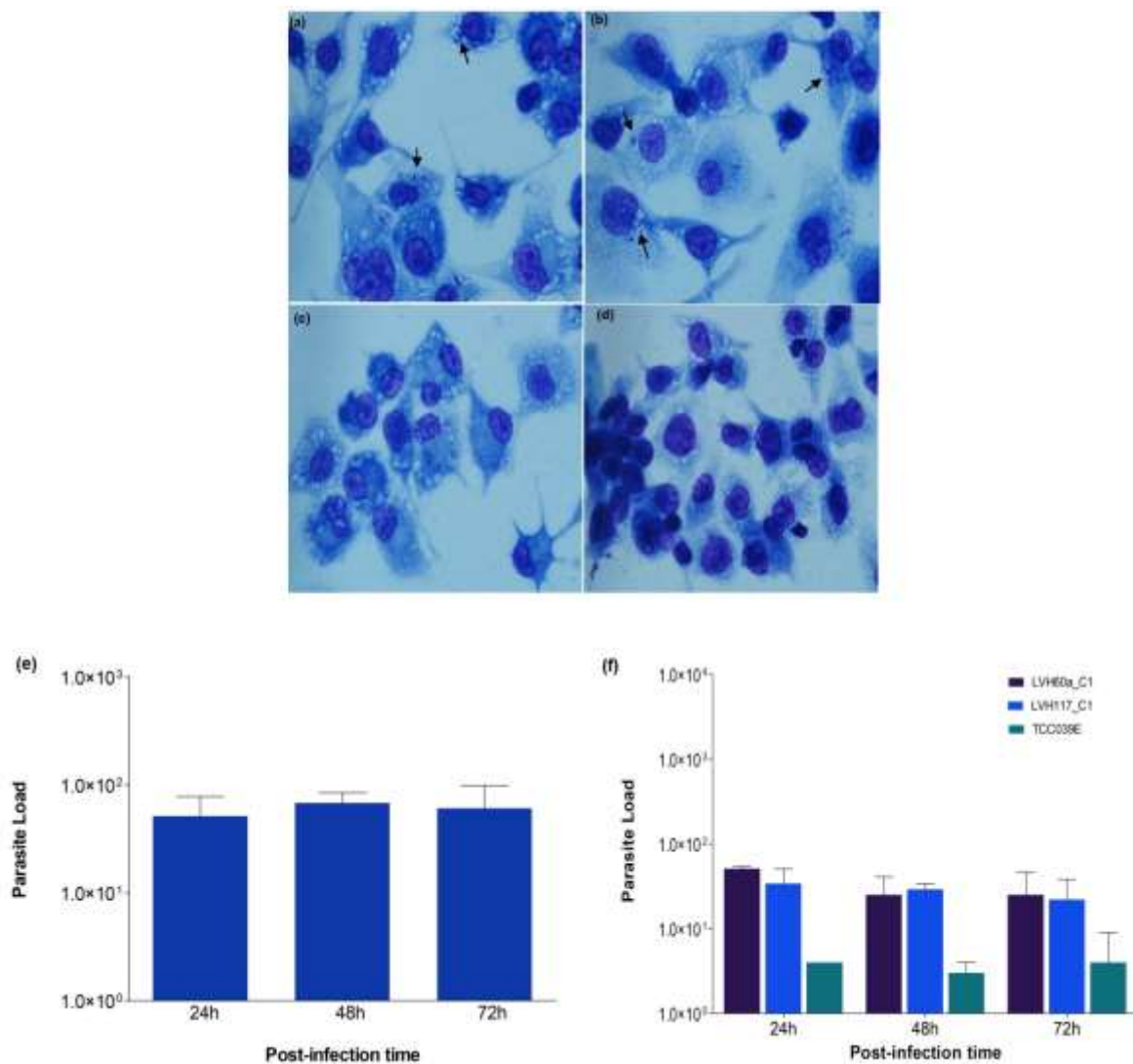
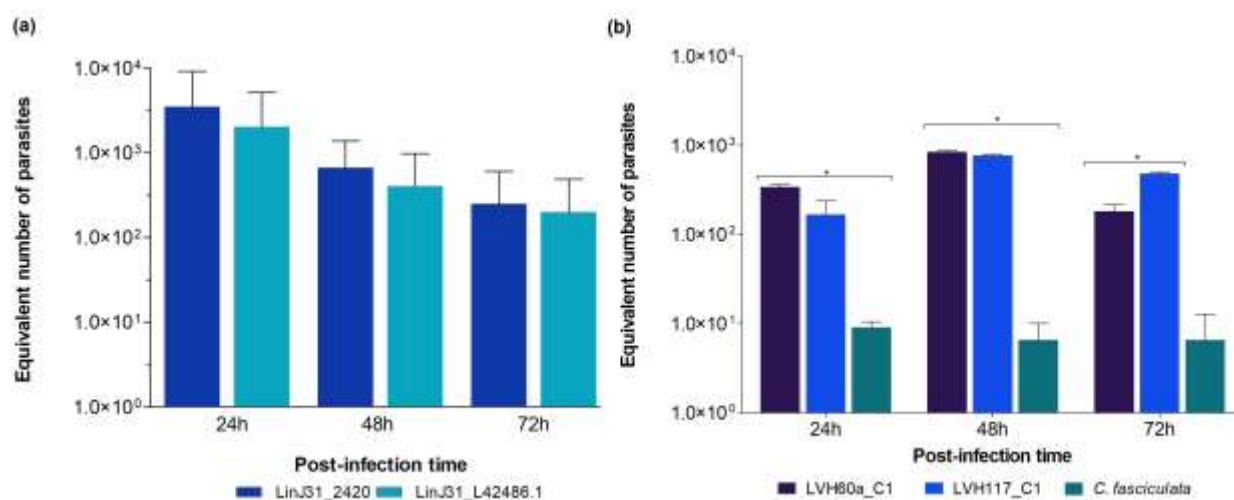


Figura 16: Macrófagos THP-1 infectados com cepa HUUSF14 (*L. infantum*), LVH60a_C1, LVH117_C1 (*Crithidia* sp LVH60A) e TCC039E (*C. fasciculata*).

(a) *L. infantum* (cepa HUUSF14), (b) semelhante a *Crithidia* (cepa LVH60a_C1), (c) *C. fasciculata* (cepa TCC039E) e (d) controle de macrófagos sem qualquer infecção 24 horas após a infecção, respectivamente. As setas pretas indicam as formas amastigotas. Imagem de microscopia óptica visualizada com imersão em óleo em

uma ampliação de 1000X. (e) Gráfico da carga parasitária medida por microscopia contando as formas amastigotas da cepa HUUFS14 em 100 macrófagos THP-1 (proporção amastigotas/100 células). (f) Gráfico da carga parasitária medida por microscopia contando as formas amastigotas da infecção com cepa LVH60a_C1 (barra de cor roxa), LVH117_C1 (barra de cor azul) e TCC039E (barra de cor verde) contabilizadas em 100 macrófagos THP-1 (proporção de amastigotas/100). O teste ANOVA two-away foi realizado usando o software Graphpad Prism 5.00 e não diferença estatisticamente significativa. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Figura 17: Quantificação de parasitas *L. infantum* e *Crithidia* em infecções *in vitro* de macrófagos derivados de THP-1.



(a) O DNA extraído de culturas THP-1 infectadas com a cepa HUUFS14 (*L. infantum*) em 24, 48 e 72 h foi usado para quantificar o número equivalente de parasitas por meio de qPCR usando o *primer* LinJ31_2420. O *primer* LinJ31_L42486.1 foi usado para comparação. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os dois *primers*. (b) DNA extraído de culturas THP-1 infectadas com LVH60a_C1 e LVH117_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) em 24, 48 e 72 h, bem com *C. fasciculata* (cepa TCC039E) foram usadas para quantificar o número equivalente de parasitas por qPCR usando o *primer* Catalase_LVH60_12060_1F. Teste ANOVA two-way foi realizado usando GraphPad Prism 5.00 para infecções com diferentes cepas de *Crithidia*; valores de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo; * $p < 0,001$. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

A curva padrão com pares de *primers* LinJ31_2420 apresentou valores médios de *Slope* de $-3,260 \pm 0,06$ com R^2 de $0,940 \pm 0,03$ e eficiência de 103,8%, enquanto a curva padrão com pares de *primers* LinJ31_L42486.1 apresentou um *Slope* médio de $-3,030 \pm 0,06$, R^2 : $0,970 \pm 0,03$ e 117,09% de eficiência. A carga parasitária para *L. infantum* em 24h, 48h e 72h foi de ~2766, ~493 e ~241 parasitas, respectivamente.

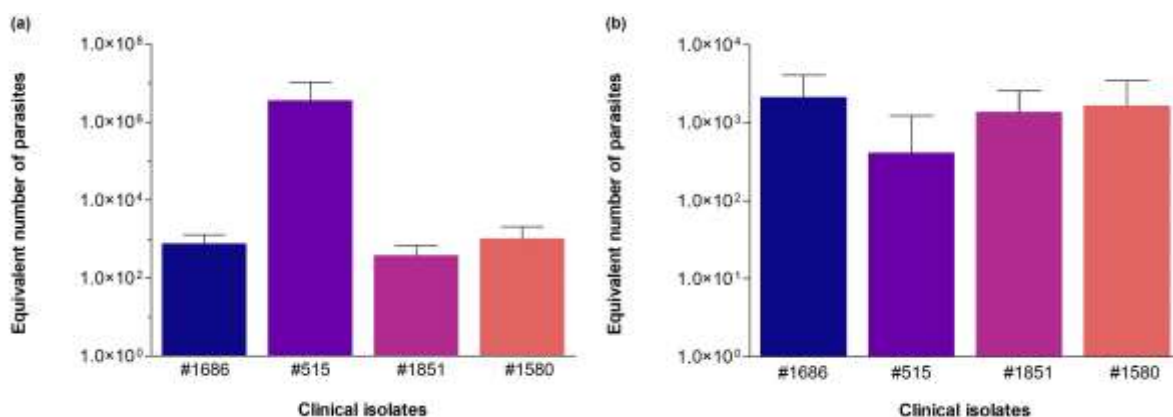
A curva padrão com par de *primers* catalase apresentou *Slope* médio de -3,412 com R^2 de $0,972 \pm 0,002$ e eficiência de 96,2%. Parasitas LVH60a_C1 do estudo de Maruyama *et al.* (Maruyama *et al.*, 2019) e isolado LVH117_C1 do trabalho de Rogerio *et al.* (Rogerio *et al.*, 2023) foram capazes de infectar macrófagos. Em média, foi quantificado em 463 parasitas em 12 ng de DNA de THP-1, quantidade que corresponde a 18.000 células humanas. Nas

infecções com *C. fasciculata* (TCC039E), um número muito menor de parasitas foi quantificado (~10 parasitas em 18.000 células humanas).

4.2.2. Infecção em modelo animal

Foram feitas as estimativas da carga parasitária de tecidos (fígado e baço, usando 20 ng de DNA/reação) provenientes de experimentação de infecção *in vivo* em hamster sírio com isolados clínicos de pacientes diagnosticados com LV (isolados 515, 1580, 1686 e 1851) obtidos de pacientes de Teresina, Píauí. O DNA de HUUFS14 (*L. infantum*) foi usado para construir a curva padrão apresentando Slope de -3,106, R^2 de 0,966 e eficiência de 109,88%. A carga parasitária no fígado foi estimada em média de ~727 parasitas, destacando a cepa 515 que se mostrou 1.000 vezes mais parasitas nesse órgão indicando a alta capacidade infectiva desse isolado (Figura 18a). No baço, a carga parasitária foi de ~1.725 número equivalentes de parasitas (Figura 18b). As reações de controle para detecção de DNA de hamster (20 ng) foram realizadas com o *primer* G3PDH. No fígado, as amostras apresentaram valores médios de Cq de $20,32 \pm 0,12$ e no baço foi de $20,22 \pm 0,05$ utilizando *primer* G3PDH como controle endógeno.

Figura 18: Quantificação de *L. infantum* em órgãos de hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a infecções experimentais *in vivo* com isolados clínicos de Leishmania. Os isolados clínicos foram codificados como #1851, #1686, #1580 e #515.



(a) carga parasitária no fígado e (b) carga parasitária no baço, avaliada por qPCR usando o *primer* LinJ31_2420. Número equivalente de parasitas/reação (ou seja, em 20 ng de DNA do hospedeiro). A carga parasitária entre os isolados observados em cada órgão não apresentou diferenças estatisticamente significativas no número de parasitas. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado com o software GraphPad prism 5.00. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

4.3. Validação dos novos alvos em isolados clínicos, amostras de tecidos de hospedeiros vertebrados e vetores

Amostras de pacientes com diagnóstico para LV foram usados na validação dos genes espécies- específicos. O diagnóstico desses indivíduos foi confirmado por meio da observação de parasitas *Leishmania* em exame parasitológico bem como o isolamento do parasita, com material proveniente da medula óssea ou por confirmação do teste sorológico rk39 (Kalazar Detect Rapid Test), além disso, também foi levado em consideração os sintomas presentes nesses pacientes como febre, perda de peso, leucopenia, baixo número de plaquetas e hepatoesplenomegalia. O tratamento administrado a esses pacientes foi com medicamentos convencionais para a Leishmaniose Visceral conforme diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil: antimonato de meglumina (Glucantime®) e/ou anfotericina B lipossomal (AmBisome®) e constatado nos dados dos prontuários desses pacientes.

Os *primers* para PCR convencional foram aplicados como forma de triagem molecular para selecionar amostras para qPCR. Foram desenhados o *primer* LinJ31seq (444 bp) para amplificação do DNA de *L. infantum*; e para a detecção de *Crithidia* sp. os *primers* Crid2.1seq (502 bp) e LVH60_Tig001 (128 bp). Esses alvos são alternativos para identificar tais espécies com o uso da técnica de PCR convencional quando não houver recursos para aplicar a qPCR.

Os *primers* Crid2.1seq e LVH60_Tig001 não amplificaram para o material genético de DNA de *L. infantum* (cepas HUUFS14 e PP75), nem para *L. braziliensis* (cepas M2903, LTCP15171 e LTCP393), *T. cruzi* (cepas Y) ou DNA humano, como observado na Figura do apêndice 3, confirmando a especificidade dos *primers* para detecção de *Crithidia*.

Os *primers* LinJ31seq (*L. infantum*) e Crid2.1seq (*Crithidia* sp) foram usados para triar as amostras de pacientes diagnosticados com LV e de isolados clínicos de Aracajú, Sergipe, como apresenta a Tabela 9 de triagem molecular. O *primer* da região do 18S (SSU rRNA) foi usado na técnica de Nested-PCR seguida das análises de sequenciamento por Sanger (Tabelas dos dados de sequenciamento no apêndice 3 e 4). Devido à quantidade muito baixa de DNA do parasita em amostras de pacientes (medula óssea e sangue periférico) a visualização do *amplicon* LinJ31seq na eletroforese em gel de agarose foi possível após a realização do enriquecimento do produto da primeira PCR com o *primer* LinJ31seq (Figura 19).

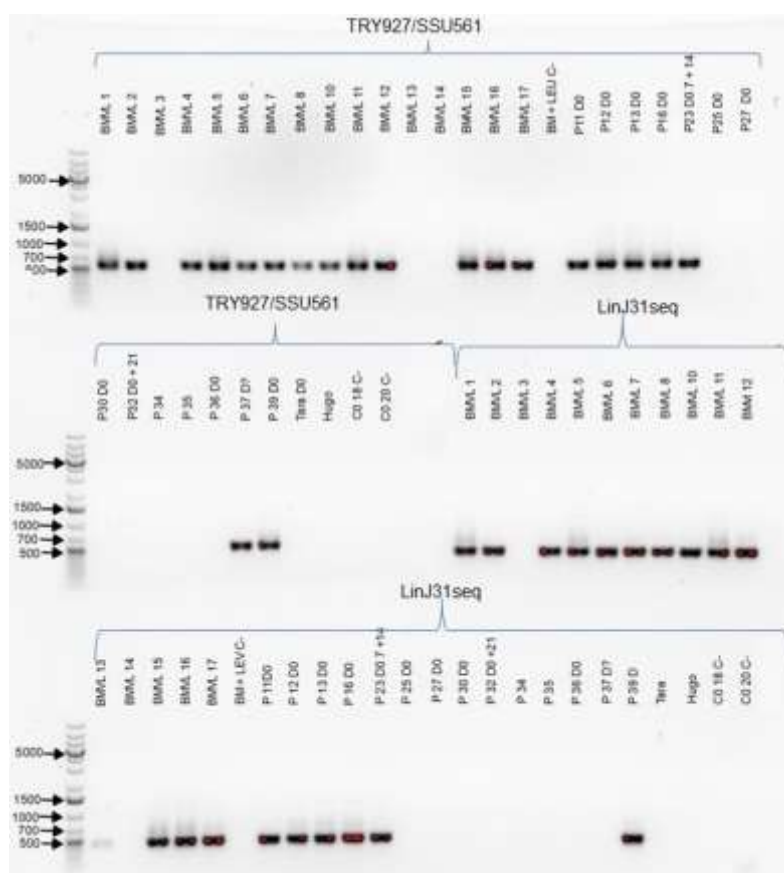
Tabela 9: Amostras de pacientes com LV e isolados clínicos triados por PCR com novos *primers* para o marcador SSU rRNA (18S).

	Tecido	Nº de amostras	PCR + LinJ31seq	PCR+ Crid2.1seq	Nested-PCR TRY927/SSU561
Amostras de pacientes	BMVL ^a	18	13	0 ^c	18
	PB	14	6	0	7
	CI ^b	53	14	48	46

Isolados clínicos	Pele (nódulo/pápula)	4	2	2	4 ^c
	Baço	1	0	1	1 ^d

^aBMLV: aspirado de medula óssea de pacientes com Leishmaniose Visceral; ^bCl: isolados clínicos, ou seja, culturas parasitárias obtidas de aspirado de medula óssea de pacientes com Leishmaniose Visceral; ^cProdutos de PCR com tamanho menor do que o esperado foi considerado negativo. PB: sangue periférico; número de acesso GenBank OQ581236.1 e OQ581229.1; ^d Número de acesso do GenBank OQ581233.1; c/d de Rogerio *et al.* (Rogerio *et al.*, 2023). Tabela reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose (1%) de PCR convencional realizada com amostras de pacientes com LV do HUUFs.



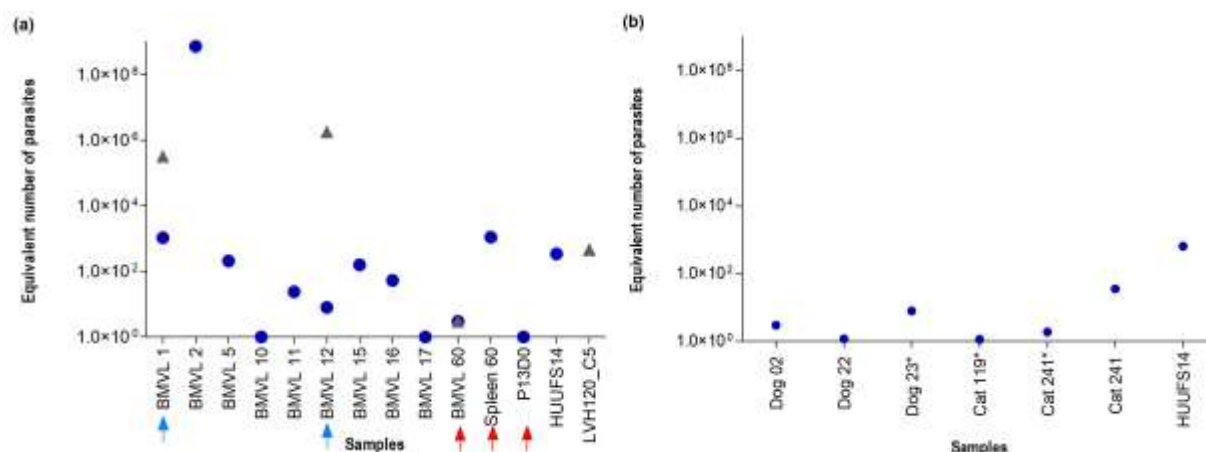
Foram utilizados o *primer* TRY927/SSU561 e *primer* espécie-específico LinJ31seq detectando as amostras de LV de pacientes. Medula óssea (BM) e sangue periférico (P). Amostra de medula óssea não infectada por tripanossomatídeos (BM+LEVC-) utilizada como controle negativo. As imagens foram capturadas por ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad) e utilizado o software Image Lab. Ladder GeneRuler 1Kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific). Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Foram realizadas a detecção e a quantificação da carga parasitária em amostras de tecidos de pacientes com LV de Aracaju, Sergipe, por meio da qPCR utilizando o *primer* LinJ31_2420 e Catalase_LVH60-12060_1F como apresenta a Figura 19a. Os seis pontos da curva padrão variaram de 1×10^1 a 1×10^6 números equivalentes de parasitas com Slope de -3,07, R^2 de 0,949 e eficiência de 111,6%. Na medula óssea em 6 ng de DNA, o limite de

detecção para 10 parasitas foi na faixa de Cq de $30,0 \pm 0,8$, algumas amostras detectaram um (1) parasita em 6 ng de DNA (Cq $34,3 \pm 0,8$). Duas amostras de medula óssea foram positivas para os dois *primers*: BMVL1 e BMVL12 sugerindo a coinfeccção nesses pacientes (Figura 20a). Também foram testadas amostras clínicas do trabalho de Maruyama (Maruyama *et al.*, 2019) nas quais a espécie *L. infantum* foi detectada no sangue e baço, e a medula óssea estava com ambos parasitas *L. infantum* e *Crithidia* sp LVH60A (Figura 20a).

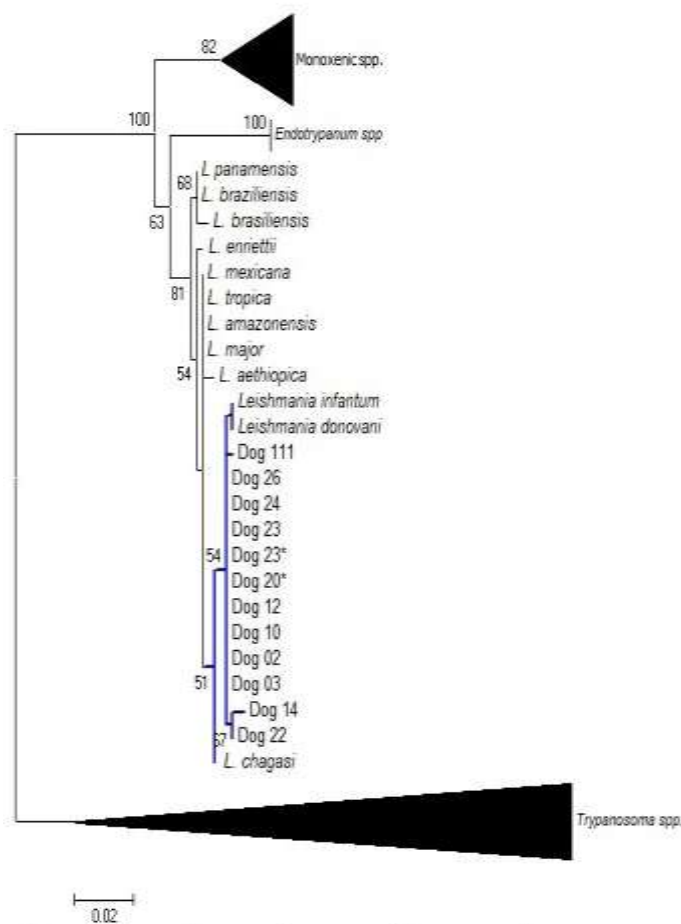
Em amostras de tecidos de cães também foram usados os *primers* LinJ31seq e Crid2.1seq. Não foi observada amplificação para *Crithidia* nas amostras de animais domésticos, apenas houve detecção com LinJ31seq (*L. infantum*). Os ensaios de qPCR com o *primer* LinJ31_2420 foi possível detectar e estimar a carga parasitária de *L. infantum* (Figura 20b). Por meio das análises de sequenciamento por Sanger do marcador taxonômico 18S rRNA, amplicon com tamanho de aproximadamente de 500 pares de base foi confirmado a espécie *L. infantum* como parasita em 10 amostras de medula óssea e 2 de sangue periférico de cães, conforme Figura 21.

Figura 20: Quantificação de parasitas *L. infantum* e *Crithidia* em amostras de pacientes com LV e animais domésticos por qPCR.



(a) Número equivalente de parasitas quantificados em amostras clínicas de aspirados de medula óssea (BMVL), baço e sangue periférico (P13D0) de pacientes com LV. A detecção de *L. infantum* e/ou *Crithidia* foi realizada utilizando os *primers* LinJ31_2420 (círculos azuis) e Catalase_LVH60_12060_1F (triângulos cinza). As setas azuis indicam coinfeccção de *L. infantum* com *Crithidia* sp. LVH60A. As setas vermelhas referem-se a amostras de pacientes de um caso fatal relatado por (Maruyama *et al.*, 2019). (b) Números equivalentes de parasitas foram quantificados em aspirados de medula óssea e sangue periférico (*) de cães e gatos com sinais clínicos de LV e teste sorológico positivo para Leishmania. Apenas *L. infantum* foi detectado em amostras de animais domésticos. O DNA de *L. infantum* (cepa HUUFS14) e *Crithidia* sp. LVH60A (cepa LVH120_C5) foi utilizado como controle positivo. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Figura 21: Árvore filogenética com seqüências de rRNA TRY927/SSU561 detectadas em amostras de medula óssea e sangue periférico de cães com LV.

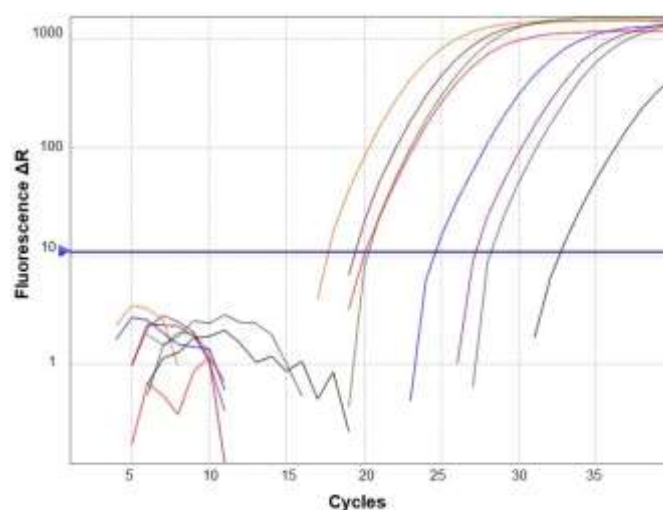


Árvore filogenética com seqüências de rRNA TRY/SSU detectadas em amostras de medula óssea e *sangue periférico de cães com LV, seqüências comparadas com banco de dados NCBI (BLASTN) e TriTrypDB. Os ramos em azul apresentam o agrupamento das amostras de cães no mesmo ramo das espécies *L. infantum* e *L. donovani*. Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

O uso do *primer* LinJ31_2420 em amostras de DNA de vetores flebotomíneos foi viável de forma qualitativa, não sendo observado amplificações para o *primer* Catalase-LVH60_12060_1F nessas amostras. DNA de sete pools de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* foram positivas para *L. infantum*, corroborando o trabalho de Ferreira *et al.* (de Sousa Ferreira *et al.*, 2018). A integridade do DNA do inseto foi verificada com a região

do gene cacofônico (IVS6) (Lins *et al.*, 2002), que apresentou Cq $24,8 \pm 5,1$ e Tm $82,40$ °C. A detecção por qPCR foi possível por meio de pré-enriquecimento usando PCR convencional com LinJ31seq. O produto dessa PCR foi usado na reação com o *primer* LinJ31_2420 apresentando valores de Cq para o vetor da amostra #10 (Cq $20,54 \pm 0,49$), vetor #63 (Cq $19,65 \pm 0,33$), vetor nº 67 (Cq $17,87 \pm 0,007$) vetor nº 75 (Cq $28,51 \pm 0,44$), vetor nº 119 (Cq $33,09 \pm 0,36$), vetor #126 (Cq $27,49 \pm 0,007$) e vetor #17 ($24,91 \pm 0,05$), como apresentado no gráfico de amplificação na Figura 22.

Figura 22: Gráfico de amplificação com primer LinJ31_2420 em amostras de flebotomíneos por qPCR.

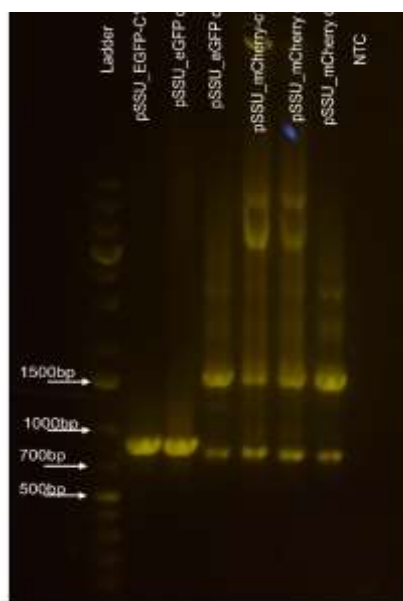


O *primer* LinJ31seq foi utilizado por PCR e o produto como molde para reação por qPCR com o *primer* LinJ31_2420 em flebotomíneos infectados com *L. infantum* do estudo de (de Sousa Ferreira *et al.*, 2018). Amplificação da cor laranja do vetor 67; amplificação da cor marrom avermelhada do vetor 63, amplificação da cor verde oliva do vetor 10, amplificação da cor azul do vetor 17, amplificação da cor roxa do vetor 126, amplificação da cor cinza do vetor 75 e amplificação da cor preta do vetor e do vetor 119. A cepa HUUF14 (*L. infantum*) foi utilizada como controle positivo nas reações (amplificação cor vermelha). Fonte: Figura reproduzida do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

4. 4. Transfecção de parasitas com gene repórter fluorescente

A confirmação dos genes repórteres após a propagação do vetor por meio das técnicas de transformação em bactéria *E. coli* DH5α foi confirmada por PCR, a amplificação do fragmento de 840 bp de pSSU_EGFP-C1/Neo e de 1490 bp de pSSU_mCherry-C1/Neo, como visualizado na Figura 23.

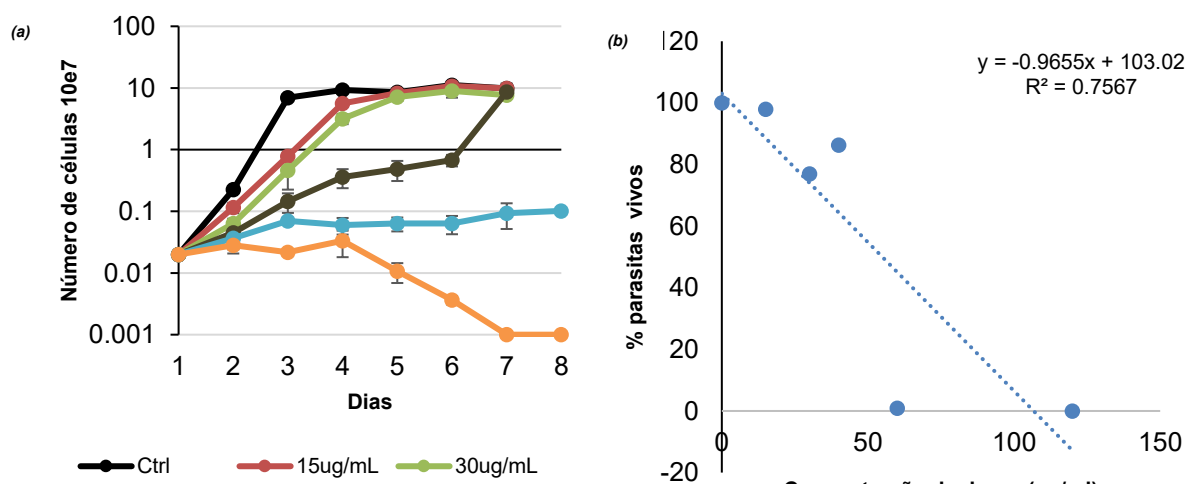
Figura 23: Produto da PCR com primer pSSU-NEO dos genes repórteres.



Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene repórter GFP, sendo pSSU_EGFP-C1/Neo material de controle (840 bp) e pSSU_EGFP col1 e col 2 o material propagado. Para a confirmação do gene mCherry, pSSU_mCherry--C1/Neo foi usado como material de controle (1490 bp) e pSSU_mCherry col1 e col 2, o material propagado. Imagem do gel visualizada em aparelho Transiluminador de LED Kasvi K33-333 e fotodocumentada por aparelho fotográfico digital (Sony Cyber-Shot DSC).

A DL₅₀ para o antibiótico G418 foi calculada apenas para a cultura de LVH60a_C1 (*Crithidia* sp LVH60A). A concentração de G418 para matar 50% da população de parasitos foi 55 µg/mL, como observado na Figura 24.

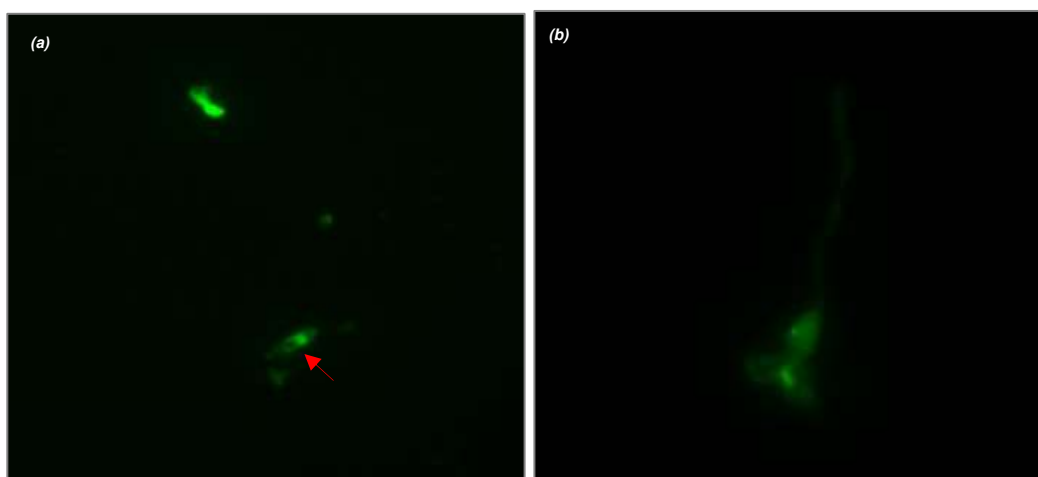
Figura 24: Gráfico da curva de crescimento e do cálculo para determinação da DL50 de G418.



(a) Curva de crescimento da cepa LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) submetidas à diferentes doses da antibiótico G418 contabilizadas ao longo de 8 dias. (b) cálculo da porcentagem de células vivas, conforme cálculo de DL₅₀ Karber (Robert V. Thurston, 1977).

A inserção do vetor pSSU_EGFP-C1/Neo na região do RNA ribossomal 18S (rRNA/SSU) da cepa LVH60a_C1 foi conduzida por meio de eletroporação, empregando diferentes protocolos de transfecção voltado para a espécie *C. fasciculata*, como mostrado na Tabela 1. O protocolo que foi capaz de transfectar o gene repórter GFP em *Crithidia* sp. LVH60A foi o usado com base no trabalho de DiMaio e colaboradores (DiMaio *et al.*, 2018), como mostra a Figura 25. No entanto, ao longo de um período de 30 dias de observação das células eletroporadas usando o antibiótico G418 1x DL₅₀, equivalente a 55 µg/ mL, ficou evidente que a utilização desses parâmetros baseados em protocolos para a espécie *C. fasciculata* não é eficaz para *Crithidia* sp LVH60A, pelo fato das células não manterem a sua viabilidade e levando à morte das células.

Figura 25: Cepa LVH60a_C1 (*Crithidia* sp LVH60A) transfectada expressando o gene repórter EGFP.

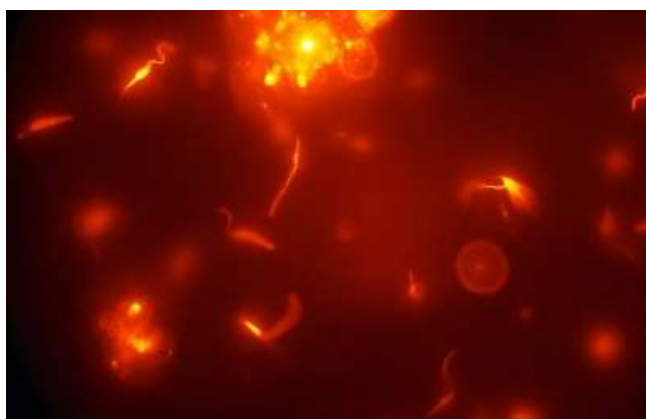


(a) Cepa LVH60a_C1 expressando o gene GFP decorridos 30 dias pós-procedimento de transfecção por eletroporação observada em objetiva de 40x. A seta vermelha aponta para o protozoário fluorescente onde é possível visualizar o formato da promastigota e a posição do núcleo. (b) vista em objetiva 100x com óleo de imersão. Acervo pessoal. Imagem de Microscopia Óptica de Fluorescência visualizada em objetiva de aumento de 400X (Microscópio de Fluorescência Olympus). Imagem acervo pessoal.

A cepa LVH60a_C1 (*Crithidia* sp LVH60A) transfectada evidenciou sensibilidade aos procedimentos de eletroporação, apresentando sinais de atividade letárgica e baixa taxa de replicação celular. A manutenção dessa cepa foi realizada em intervalos de 7 a 9 dias. Em contraste, a cepa selvagem manifesta um crescimento celular mais rápido, levando à saturação do meio em um período mais curto, como pode ser observado na Figura 24 o isolado LVH60a_C1 a fase logarítmica vista no 2º dia.

A transfecção do gene repórter mCherry na cepa HUUF14 (*L. infantum*) foi bem sucedida, permitindo a visualização da expressão em cultivo de promastigotas por meio da microscopia de fluorescência, como indicado na Figura 26. A manutenção dessas células com o antibiótico G418 possibilitou a observação de todas as células fluorescentes nas concentrações de 500 µg/ mL e 1000 µg/ mL de G418. No trabalho de Bolhasami (Bolhassani *et al.*, 2011) ao realizar o protocolo de transfecção com cepa MCAN/98/LLM-877 (*L. infantum*) iniciou a seleção com G418 na concentração de 10 µg/mL e os transfectantes foram mantidos continuamente sob condições seletivas com o antibiótico contendo até 400 µg/mL. Aqui, com a cepa HUUF14 a seleção com G418 inicial foi de 100 µg/ mL, no entanto, essa dosagem foi aumentada gradativamente sendo observadas a manutenção da fluorescência usando até 1000 µg/mL de G418 em repiques contínuos.

Figura 26: Cepa HUUF14 (*L. infantum*) transfectada expressando o gene repórter mCherry.



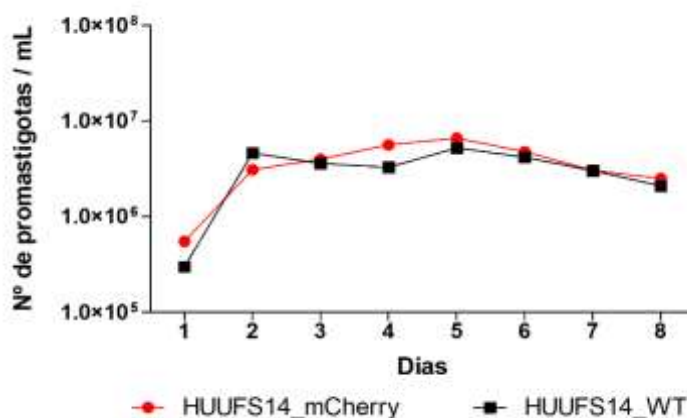
Cepa HUUF14 expressando o gene mCherry decorridos 30 dias pós-procedimento de eletroporação e recuperação com G418 na concentração 1000 µg/ mL, observado com a objetiva de 40x. Imagem acervo pessoal.

4. 4. 1. Caracterização da linhagem de HUUF14_mCherry

A curva de crescimento foi realizada ao longo de 08 dias com as cepas HUUF14 WT (selvagem) e HUUF14_mCherry ambas iniciando com 2×10^5 promastigotas/mL. Foi observada que a cepa selvagem no 2º dia de cultivo atingiu a média de $4,64 \times 10^6$ promastigotas/mL e uma quantidade semelhante foi observada para a cepa mCherry ($3,1 \times 10^6$

promastigotas/mL), conforme visto na Figura 27. Entretanto, o formato sigmoidal padrão da curva de crescimento não foi observado seja para a cepa selvagem ou para a transfectada. Esse resultado de capacidade proliferativa em cultura foi inconclusivo, sendo necessário mais informações. O teste estatístico two-way ANOVA não indicou diferença estatísticas entre as curvas de crescimento.

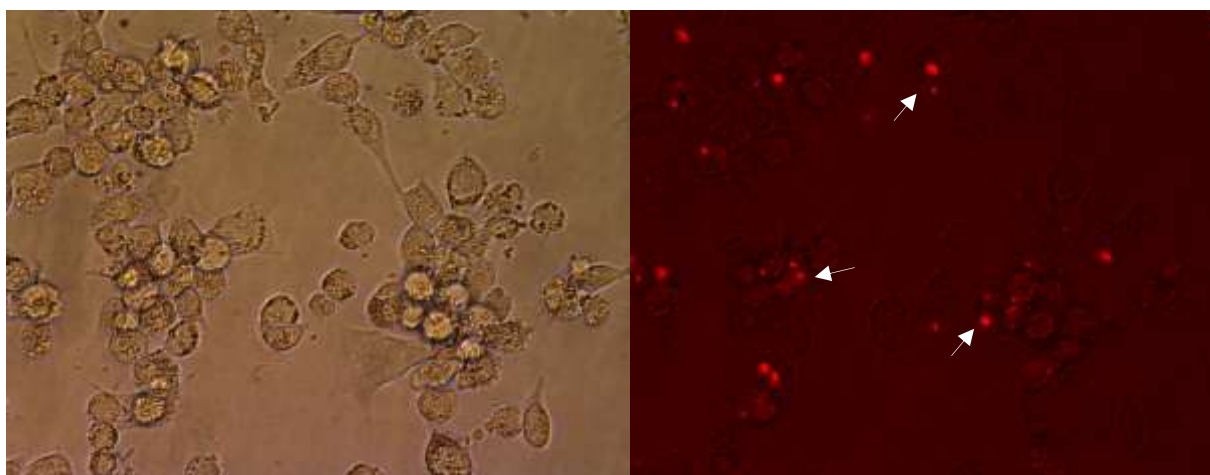
Figura 26: Gráfico da curva de crescimento da cepa HUUFS14_mCherry em comparação com cepa selvagem de HUUFS14 (*L. infantum*).



Curva de crescimento realizada com cepa HUUFS14_mCherry (*L. infantum* transfectada) em comparação com a cepa HUUFS14 WT (selvagem não transfectada). Contagem realizada no período de 08 dias, as células foram mantidas em incubadora à 27°C. A cepa HUUFS14_mCherry foi mantida com a G418 (1000 µg/ mL) durante os dias da contagem.

O ensaio de infecção *in vitro* com a linhagem HUUFS14_mCherry foi feito em macrófagos THP-1 afim de avaliar a atividade de fluorescência de amastigotas dessa linhagem. A HUUFS14_mCherry foi usada para infectar THP-1 nos tempos de 24, 48 e 72 horas e a expressão foi monitorada por microscopia invertida de fluorescência objetiva de 20x (Nikon Ti-5- Eclipse Intensilight C- HGFI), a Figura 28 indicam as formas amastigotas expressando mCherry no período de infecção de 48 horas.

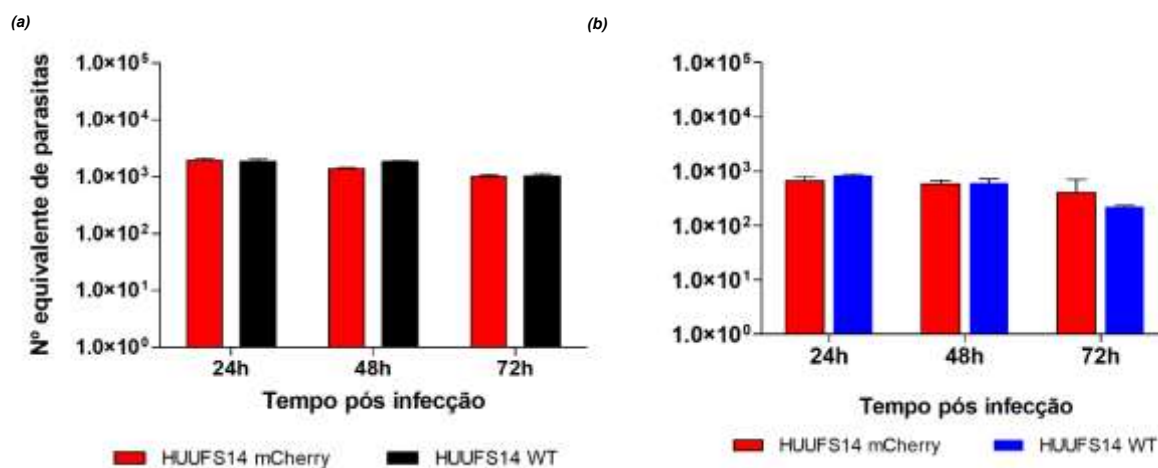
Figura 27: Infecção *in vitro* em THP-1 com cepa de *L. infantum* transfectada com o gene repórter mCherry.



Infecção com macrófagos THP-1 pós infecção do tempo de 48 horas observadas em campo de luz claro e em seguida o mesmo quadrante observado com filtro de espectro verde que capta a fluorescência vermelha. As setas indicam as formas amastigotas fluorescentes de HUUFS14 mCherry internalizadas pelos macrófagos. Imagem de Microscopia Invertida de Fluorescência objetiva de 20x (Nikon Ti-5- Eclipse Intensilight C- HGFI). Imagem acervo pessoal.

A estimativa da carga parasitária foi feita tanto por contagem em microscopia de luz como também em qPCR usando o *primer* LinJ31_2420 com a linhagem transfectada HUUFS14 mCherry e a cepa selvagem HUUFS14. A curva padrão foi construída usando DNA HUUFS14 selvagem (WT) com um Slope de -3,258 coeficiente de linearidade R^2 de 0,957 e a eficiência 109%. Os padrões de infectividade da linhagem HUUFS14 mCherry manteve em comparação com infecção com a cepa HUUFS14 selvagem, como apresentado na quantificação por qPCR e microscopia da Figura 29, respectivamente. O teste estatístico Two-way ANOVA foi aplicado e não apresentou diferenças estatísticas significantes.

Figura 28: Estimativa da carga parasitária por qPCR com *primer* LinJ31_2420 e por microscopia.



(a) estimativa da carga parasitária das infecções por qPCR com o *primer* espécie- específico para *L. infantum* usando a linhagem HUUFS14 mCherry e a cepa HUUFS14 selvagem (WT). (b) estimativa da carga parasitária feita por contagem microscópica. O teste estatístico Two-way ANOVA foi aplicado e não apresentou diferença significantes em ambas análises. Gráficos gerados pelo programa GraphPad Prism 5.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5. 1. Alvos gênicos espécie- específicos para detecção molecular de parasitas

Os tipos de diagnóstico utilizados para a Leishmaniose Visceral empregam métodos tanto parasitológicos quanto sorológicos para detectar a presença do parasita em hospedeiros vertebrados, incluindo pacientes humanos e animais domésticos (de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). Com o advento e desenvolvimento de novas ferramentas em biologia molecular houve um foco para a detecção, identificação e quantificação da carga parasitária com foco no material genético em amostras clínicas. Conforme Guerbouj (Guerbouj *et al.*, 2014) ferramentas moleculares possibilitam a distinção entre as espécies por meio de alvos específicos, tornando-se instrumentos nos estudos de diversidade das espécies *Leishmania* e na análise de distribuição populacional desses parasitas.

A literatura apresenta uma variedade de protocolos e ensaios envolvendo a técnica de PCR em amostras humanas, animais e flebotomíneos, evidenciando sua utilidade em pesquisas. Contudo, a padronização desses métodos ainda é necessária para poderem ser adotados como ferramentas diagnósticas integradas à rotina médica (de Ruiten *et al.*, 2014; Guerbouj *et al.*, 2014; Reithinger; Dujardin, 2007). Outra dificuldade é na necessidade de assegurar uma boa sensibilidade na detecção do DNA do parasita em amostras clínicas, ao passo que a especificidade dos alvos projetados é um desafio contínuo, tendo em vista a identificação precisa da espécie de *Leishmania* responsável por causar a doença. Essa distinção é crucial na determinação do tratamento adequado e no prognóstico da doença (Filgueira *et al.*, 2020; Reimão *et al.*, 2020).

Estudos tem evidenciado a presença de tripanossomatídeos monoxênicos como *Leptomonas* (Ghosh *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2020) e *Crithidia* (Barazesh *et al.*, 2019; Ghobakhloo *et al.*, 2019; Maruyama *et al.*, 2019; Rogerio *et al.*, 2023) em casos clínicos de pacientes com Leishmaniose. Na revisão realizada por Boucinha (Boucinha *et al.*, 2022) foram indicados vários estudos que evidenciam a presença desses parasitas monoxênicos em casos de Leishmanioses atípicas e suspeitas, porém as investigações de rotina se concentram apenas nos parasitas patogênicos conhecidos. De acordo com Yurchenko e colaboradores (Yurchenko; Butenko; Kostygov, 2021) estudos de filogenômica desses parasitas do grupo Crithidiatae devem ser aprofundadas para compreender a evolução, diversidade e ciclo de vida.

Neste trabalho, projetamos alvos espécie-específico para *L. infantum* (LinJ31_2420 e LinJ31seq), bem como para a detecção de *Crithidia* sp LVH60A e *C. fasciculata*

(Catalase_LVH60-120_1F, Crid2.1seq e LVH60_Tig001) em ensaios usando as técnicas de PCR e qPCR em diferentes amostras clínicas e experimentais como forma de triagem molecular, detecção e de identificação. É crucial considerar os alvos escolhidos para o diagnóstico de qPCR, optando por genes específicos da espécie. Alvos com base no kDNA pode render dados menos robustos devido à heterogeneidade presente em minicírculos, onde o número de cópias varia entre os cinetoplastídeos (Weirather *et al.*, 2011). Genes constitutivos como os baseados na região 18S (SSU rRNA) podem apresentar ampliações cruzadas com o DNA de outros tripanossomatídeos não sendo possível a distinção apenas por detecção, sendo necessário o sequenciamento desse alvo amplificado (Filgueira *et al.*, 2020).

O *primer* LinJ31seq e LinJ31_2420 projetados neste estudo foram desenhados com base no gene da p-nitrofenilfosfatase, uma enzima que desempenha um papel fundamental nas vias de hidrólise, catalisando a conversão de p-nitrofenol e fosfato. Em *Leishmania*, essa enzima desempenha um papel crucial no metabolismo celular, na regulação do metabolismo de fosfato e na sobrevivência celular (Fernandes *et al.*, 2013; Nandi; Sarkar, 1995). O *primer* Catalase_LVH6_12060_1F foi projetado com base no gene da enzima catalase que desempenha um papel importante no ajuste de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a níveis intracelulares (Kraeva *et al.*, 2017). Sendo ausente em tripanossomatídeos patogênicos, como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., e encontrado apenas em tripanossomatídeos monoxênicos (*Crithidia* spp., *Leptomonas* spp.) (El-Sayed *et al.*, 2005; Horáková *et al.*, 2020; Kraeva *et al.*, 2017).

O *primer* Catalase LVH60-12060_1F foi específico para *Crithidia* sp. LVH60A e para *C. fasciculata* (cepa TCC039E) conforme visto nas análises do *amplicon* de 107 bp do gene está presente em quatro cópias em diferentes cromossomos de ambas as espécies, apresentando diferenças sutis em suas composições nucleotídicas que podem ser inferidas nas análises de curva de dissociação. Dependendo do teor de GC dos *amplicons* pode haver a presença de um pico discreto anterior ao pico único no perfil de dissociação. Isso pode ser atribuído ao fato de que regiões estáveis e ricas em GC podem não se dissociar completamente de maneira imediata. Consequentemente, essas regiões permanecem na forma de *double stranded DNA* (dsDNA) até que alcancem a temperatura ideal para a dissociação completa. Outra explicação é a possível heterogeneidade do *amplicon*, como a presença de regiões com polimorfismos, essas variações na sequência podem resultar em diferentes temperaturas de dissociação, o que se reflete em múltiplos picos distintos na análise de dissociação (Nick Downey, 2014).

Ensaio com base em corantes intercalantes podem fornecer a discriminação de espécies por meio das análises da curva de dissociação, que é influenciada pela riqueza de

GC, porém devem ser avaliados cuidadosamente afim de evitar interpretações errôneas devido as variações que podem ser observadas na temperatura de fusão (Weirather *et al.*, 2011; Zampieri *et al.*, 2016).

Através do cálculo da massa de DNA do parasita com base no tamanho do genoma *L. infantum* e de *Crithidia* sp. LVH60A, demonstramos a capacidade de estimar a carga parasitária e detectar o material genético desses parasitas em amostras clínicas. Empregamos uma quantidade fixa de DNA de cada hospedeiro (humano, cão, gato e camundongo) não infectado como pano de fundo nas reações da construção da curva padrão e isso não interferiu nos resultados do ensaio. No estudo de Jara (Jara *et al.*, 2013), um ensaio de qPCR foi empregado para detecção e quantificação de protozoários em lesões cutâneas e mucocutâneas avaliando-se o impacto do DNA do hospedeiro (20 ng de DNA humano) observando que esta concentração não produziu nenhuma alteração em seus resultados, havendo a detecção apenas do parasita. A quantificação da carga parasitária por meio da construção de uma curva padrão é uma medida indicativa ao se comparar com a real carga parasitária dos tecidos/ medula óssea dos hospedeiros. Devem ser levados em consideração fatores como estágio de infecção em que os indivíduos se encontram e o processo de extração de DNA, uma vez que pode acarretar em perdas de material tornando essa forma de quantificação menos robusta (Sudarshan; Sundar, 2014).

A precisão e especificidade do ensaio foi avaliada por meio do ensaio de *spike-in* ao realizar a simulação de um cenário de coinfeção entre parasitas *L. infantum* e *Crithidia* sp LVH60A indicando a exatidão de cada *primer* em relação ao alvo correspondente, ou seja, ambos os *primers* possuem a capacidade de detectar as espécies dentro de um espectro de coinfeção. A baixa porcentagem de eficiência observada nos ensaios de *spike-in* com o *background* de cães e camundongos podem ter relação com o DNA desses hospedeiros ou quantidades de material relativamente altas nas reações por a falha manual nas diluições.

No modelo experimental de infecção *in vivo* com o *primer* LinJ31_2420 foi capaz de detectar e de estimar a parasitemia nos órgãos dos animais infectados por *L. infantum*. Pesquisas para compreensão da infecção e das manifestações clínicas da LV podem ser investigadas utilizando modelos experimentais suscetíveis, como no caso o hamster sírio. Esses modelos permitem avaliar diferentes vias de infecção e o uso de diversas estirpes de *L. infantum*, como visto no trabalho de Moreira (Moreira *et al.*, 2016). A análise da carga parasitária por qPCR permite a comparação entre cepas mais virulentas e na compreensão da evolução clínica de alguns casos de LV. É importante destacar que todos os hamsters adquiriram infecções sistêmicas (fígado e baço) ao serem infectados pelas cepas 1686, 1580, 1851 e 515 que são isolados clínicos identificados como sendo da espécie *L. infantum*.

Em ensaios de infecções *in vitro* com THP-1 foi averiguada a capacidade destes parasitas *Crithidia* sp LVH60A de infectar os macrófagos, sendo usados neste experimento a cultura isolado do caso atípico relatado por Maruyama (Maruyama *et al.*, 2019) (isolado LVH60a-C1) e recentemente do relato de caso de LV do trabalho de Rogerio (Rogerio *et al.*, 2023) (isolado LVH117_C1). Utilizando os *primers* de qPCR LinJ31_2420 e Catalase-LVH60_12060_1F e também por análises microscópicas foi possível detectar e estimar a carga parasitária dessas infecções. A quantificação da carga parasitária através da microscopia e da qPCR revela diferenças consideráveis com relação a quantificação, o que pode gerar interferências na interpretação dos resultados. Embora a microscopia seja a técnica usual para visualizar os parasitas em amostras de tecido, torna-se desafiadora em cenários de baixa carga parasitária, inviabilizando a identificação precisa das formas amastigotas. Além disso, a quantificação por microscopia pode ser subjetiva, uma vez que está sujeita à habilidade do profissional em identificar e contabilizar, o que pode resultar em variações na avaliação quantitativa (Prina *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010).

A detecção usando qPCR é mais sensível e precisa do que por microscopia, Verma e colaboradores (Verma *et al.*, 2010) em seu estudo envolvendo ensaios de qPCR e exames microscópicos em aspirados de medula óssea de pacientes com LV e lâminas de esfregaço de lesões nodulares/papulares de casos de Leishmaniose Dérmica Pós Calazar (PKDL), eles alcançaram 100% de positividade por meio de qPCR em todas as amostras. Por outro lado, a taxa de positividade foi menor quando avaliada por microscopia, com 57% para amostras de medula óssea e 50% para casos de PKDL. Além disso, os autores quantificaram com sucesso a carga parasitária nessas amostras usando qPCR.

No contexto da LV em animais domésticos como cães e gatos, o *primer* LinJ31_2420 para qPCR teve bom desempenho ao detectar e estimar a carga parasitária em amostras de medula óssea e de sangue periférico desses animais, indicando a infecção por *L. infantum*. No trabalho de Castelli (Castelli *et al.*, 2021) diferentes amostras de sangue, soros e nódulos linfáticos de cães e gatos foram usados por diferentes métodos diagnósticos sendo evidente que a análise por qPCR demonstrou uma taxa de positividade significativamente maior em comparação com outros testes, como o ensaio de imunofluorescência indireta, a cultura parasitária e a microscopia. Tsokaca *et al.* (Tsokana *et al.*, 2014) destaca o emprego da PCR como método de diagnóstico para a Leishmaniose canina, especialmente nos casos de animais clinicamente saudáveis, que não manifestam a doença, porém abrigam os parasitas desempenhando um papel significativo como reservatórios.

O uso de ferramenta moleculares, como as técnicas de PCR, é de suma importância no auxílio dos diagnósticos é de suma importância e podendo ser usado na triagem molecular tanto de amostras clínicas como na investigação de isolados clínicos, como apresentado

neste estudo usando a PCR com alvos para *L. infantum* (LinJ31seq) e *Crithidia* sp (Crid2.1seq e LVH60_Tig001). Em estudo de triagem molecular realizado por Pereira e colaboradores (Pereira *et al.*, 2021) em bancos de sangue de áreas endêmicas para a LV conseguiram detectar DNA desses parasitas em amostras de doadores de sangue. Portanto, estudos reforçam o uso de métodos moleculares como alternativa no diagnóstico de rotina para a Leishmaniose, principalmente nos casos em que os pacientes apresentam baixa carga parasitária, são assintomáticos e colaborando também para a compreensão da distribuição da doença em regiões endêmicas (Reina *et al.*, 2022; Weirather *et al.*, 2011).

O presente estudo demonstrou por meios dos ensaios de validação e da aplicação em amostras reais a possibilidade de detectar tanto o parasita *L. infantum* como o de *Crithidia* sp. LVH60 averiguando a existência de casos de coinfeção. Através da qPCR com os *primers* LinJ31_2420 (*L. infantum*) e Catalase-LVH60_12060_1F (*Crithidia* sp. LVH60A) foram detectados e estimados a carga parasitária de três amostras com coinfeção por *L. infantum* e *Crithidia* sp LVH60A: BMVL1, BMVL12 e BMVL60. Esta última, BMVL60 pertence ao estudo de Maruyama (Maruyama *et al.*, 2019). Como observado no trabalho de revisão de Boucinha (Boucinha *et al.*, 2022) estudos têm observado a presença frequente de tripanossomatídeos monoxênicos no contexto das Leishmanioses, especialmente em casos clínicos com recidivas múltiplas e resistência aos tratamentos convencionais antileishmania. O aumento desses relatos e evidências de coinfeções foram feitas por análises de sequenciamento de DNA e isoenzimas de amostras de biópsia de tecidos de pacientes e de isolados clínicos, essas análises identificaram o parasita destacando a importância de se aprofundar nas investigações e desenvolvimento de diagnósticos mais específicos. Isso ocorre porque o diagnóstico de rotina para a Leishmaniose é baseado principalmente na observação direta de esfregaços e em testes sorológicos, os quais não possibilitam a distinção a nível de espécie por meio dessas técnicas apenas que à a positividade para um tripanossomatídeo (Boucinha *et al.*, 2022).

A coinfeção entre *Leishmania* e tripanossomatídeos monoxênicos, especialmente por *Crithidia* sp. como visto em alguns estudos (Doudi *et al.*, 2015; Ghobakhloo *et al.*, 2019; Kalantari *et al.*, 2018; Maruyama *et al.*, 2019; MIRZAPOUR *et al.*, 2019; Rogerio *et al.*, 2023) podem ser recorrentes, porém, ainda é encarada com certa cautela pela comunidade científica. Portanto, é essencial aprofundar as investigações por meio de sequenciamento direto de DNA em biópsia de pacientes com Leishmaniose e em isolados clínicos (Boucinha *et al.*, 2022). Essas descobertas merecem investigações mais aprofundadas para compreendermos melhor a função desses parasitas e seu papel no desenvolvimento da patologia da doença. É evidente a necessidade de avaliar amostras adicionais de pacientes com Leishmaniose (Kraeva *et al.*, 2015). Além disso, é fundamental realizar uma triagem

molecular abrangente de casos graves e atípicos de Leishmaniose utilizando essas técnicas moleculares, como os alvos espécie-específicos projetados neste estudo, a fim de obter informações relevantes sobre esses parasitas monoxênicos em seres humanos.

5. 2. Linhagem de parasita expressando gene repórter fluorescente

Os genes repórteres possuem uma ampla aplicabilidade e contam com protocolos reprodutíveis para o estudo em parasitas, que tem como finalidade ser capaz de expressar o produto gênico desejado sem interferir na estrutura e funcionalidade da célula endógena (Dube; Gupta; Singh, 2009). Nas pesquisas com *Leishmania*, os genes repórteres desempenham um papel diversificado em pesquisas que abrangem a biologia celular e o monitoramento de novos medicamentos destinados ao tratamento. A maioria dos protocolos existentes para transfecção de espécies da subfamília Leishmaniinae foi desenvolvida para o gênero *Leishmania*. Conseqüentemente, existem muitas linhagens de *Leishmania* com gene repórter, geralmente baseados na inserção da região 18S (SSU rRNA) por técnicas de transfecção com DNA episomal ou por integração por recombinação homóloga (Dube; Gupta; Singh, 2009; Jara *et al.*, 2019; Sean há *et al.*, 1996).

ConformáHa *et al.* (Shán Ha *et al.*, 1996) genes repórteres, como os baseados em GFP por exemplo, indicam a técnica pela viabilidade de serem reprodutíveis e de fácil monitoramento em ensaios de infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que facilitam a visualização e a contagem de formas amastigotas que expressam o gene. Além disso, eles também são essenciais para estudos que englobam a realização de testes de novos fármacos e a análise da resistência do parasita.

Contudo, é necessário realizar considerações criteriosas ao optar por uma metodologia de transfecção de gene repórter usando um gene transitório, como o caso do material episomal. Apesar da facilidade em reproduzir a técnica por meio desse material e pela baixa toxicidade nas células endógenas, os vetores episomais apresentam a possibilidade de perda do plasmídeo na ausência de uma substância seletiva constante no meio, como é o caso do antibiótico G418. Além disso, a expressão gênica pode variar consideravelmente entre os parasitas devido à heterogeneidade da população resultando em uma baixa sensibilidade (Mißlitz *et al.*, 2000).

Os protocolos adotados com a cepa LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) se basearam em métodos de transfecção usados para *Leishmania* (Bolhassani *et al.*, 2011) e para *C. fasciculata* (DiMaio *et al.*, 2018). No entanto, é importante notar que a cepa em análise pode não ser semelhante à espécie *C. fasciculata*, como evidenciado nos trabalhos de análises filogenômicas realizadas por Maruyama *et al.* (Maruyama *et al.*, 2019) e Rogerio *et al.*

(Rogerio *et al.*, 2023). Portanto, a falta de sucesso na transfecção utilizando esses protocolos pode ser devido à ausência de métodos otimizados para este novo parasita. Em alguns organismos, existem protocolos de transfecção estabelecidos e otimizados ao longo do tempo. No entanto, para algumas *Crithidia* sp., pode haver uma carência de métodos de transfecção expressivos e eficientes devido às suas características genéticas pouco estudadas e à falta de pesquisas específicas com esses parasitas. Neste trabalho, não obtivemos sucesso nessa otimização e mais testes serão necessários em outros estudos futuros.

O gene que codifica a mCherry é uma variante derivada da proteína DsRed, isolados de cnidários do gênero *Discosoma* referente à uma proteína fluorescente vermelha homóloga à GFP (Mikhail V. Matz, 1999; Shaner *et al.*, 2004). O gene repórter mCherry foi empregado em diversos estudos com parasitas *Leishmania*, como no trabalho de Calvo-Alvarez *et al.* (Calvo-Álvarez *et al.*, 2012, 2015), em que realizaram o monitoramento da carga parasitária por fluorescência com *Leishmania major* em infecções e tratamento por diferentes fármacos. No trabalho de Corman e colaboradores (Corman *et al.*, 2019) avaliaram promastigotas de *Leishmania donovani* mCherry em infecções *in vitro* com THP-1 destacando a resistência a um componente químico para avaliação de uma terapia combinada antileishmania. Estudos com culturas promastigotas *L. infantum* mCherry de infecção *in vitro* em macrófagos e *in vivo* também foram feitos por Zorgi (Zorgi *et al.*, 2020) para a avaliação das respostas imunológicas.

Neste estudo, apresentamos uma linhagem de *L. infantum* transfectante derivada da cepa HUUFS14, que é usada como referência no laboratório. Essa linhagem foi modificada para expressar o gene repórter mCherry (proteína fluorescente vermelho). Também foi possível fazer a caracterização fenotípica desse transfectante com relação à infectividade *in vitro* ao se comparar com os ensaios realizados com cepa HUUFS14 selvagem. A não obtenção de uma estirpe de LVH60a_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) com GFP usando os protocolos de transfecção com os genes repórteres indicam a necessidade de estabelecer protocolos para estes tripanossomatídeos, como por exemplo a construção de um vetor baseado nas análises do genoma de *Crithidia* sp. LVH60A. O material usado neste estudo foi baseado no vetor desenvolvido para *Leishmania*. Com as novas tecnologias de edição gênica, é possível avançar com as metodologias desenvolvidas, como o CRISPR (BENEKE; GLUENZ, 2019; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014) e DiCre (Damasceno *et al.*, 2019). Em suma, o estabelecimento de uma *Crithidia* sp LVH60A expressando um gene repórter fluorescente poderão ser utilizados em ensaios de infecção *in vitro* visando a simulação de um cenário de coinfeção com a linhagem de *L. infantum* HUUFS14 mCherry irão auxiliar na compreensão e nos mecanismos de interação entre esses parasitas e o hospedeiros para

avaçar no conhecimento sobre os casos de coinfeção, como os vistos nos trabalhos de Maruyama (Maruyama *et al.*, 2019) e de Rogerio (Rogerio *et al.*, 2023).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível concluir que:

1) Alvos gênicos espécies-específicos para *Leishmania infantum* (LinJ31seq e LinJ31_2420) e *Crithidia* sp (Crid2.1seq, LVH60_Tig001 e Catalase-LVH60_12060_1F) foram obtidos para a detecção de parasita de forma acurada e distintiva;

2) Foi possível padronizar e validar por meio das técnicas de PCR, tanto convencional como em tempo real (qPCR) ensaios tanto para a detecção como para a estimativa da carga parasitária;

Os *primers* detectam e quantificam a carga parasitária em diferentes tipos de amostra, tanto clínica (pacientes e animais domésticos com LV) quanto experimental (modelo de infecções *in vitro* e *in vivo*), podendo ser úteis para auxiliar no diagnóstico da LV em laboratórios e centros de referência diagnóstica;

3) Os *primers* serão úteis como uma ferramenta de triagem molecular e investigações aprofundadas de isolados clínicos;

4) Dentro do contexto de coinfeção por *Crithidia* sp., os alvos têm o potencial de desempenhar um papel crucial na compreensão de casos atípicos de pacientes com LV.

5) Parasitas *L. infantum* mCherry desenvolvidos neste estudo são capazes de expressar o gene por meio da técnica de transfecção utilizando o vetor episomal em ambas as formas celulares: promastigota em cultivo e após a infecção *in vitro* sendo observadas as formas amastigotas fluorescentes no interior de macrófagos.

6) Estudos e pesquisas envolvendo o parasita *Crithidia* sp LVH60A, como o de construir uma linhagem transfectante, devem ser aprofundadas a fim de compreender a biologia e evolução desse novo parasita emergente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, Ibrahim et al. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. **BMC infectious diseases**, [s. l.], v. 13, p. 153, 2013.

ADAUI, Vanessa et al. SYBR Green–based quantitation of human T-lymphotropic virus type 1 proviral load in Peruvian patients with neurological disease and asymptomatic carriers: Influence of clinical status, sex, and familial relatedness. **Journal of Neurovirology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 456–465, 2006.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALCOLEA, Pedro J. et al. An Insight into the Proteome of *Crithidia fasciculata* Choanoflagellates as a Comparative Approach to Axenic Growth, Peanut Lectin Agglutination and Differentiation of *Leishmania* spp. Promastigotes. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. e113837, 2014.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, Lysangela R. et al. mRNA localization mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **PloS One**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e81375, 2013.

ARONSON, Naomi 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). **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. e202–e264, 2016.

ASLETT, Martin et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 38, n. Database issue, p. D457–D462, 2010.

AZAMI-CONESA, Iris; GÓMEZ-MUÑOZ, María Teresa; MARTÍNEZ-DÍAZ, Rafael Alberto. A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic Leishmania. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1101, 2021.

BARAZESH, Afshin et al. Molecular Identification of Species Caused Cutaneous Leishmaniasis in Southern Zone of Iran. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 198–205, 2019.

BARKER, E. N. et al. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 167–170, 2010.

BATES, Paul A. Revising *Leishmania*’s life cycle. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018.

BEATTIE, L. et al. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 255–266, 2008.

BELL, Andrew S.; RANFORD-CARTWRIGHT, Lisa C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 338–342, 2002.

BENEKE, Tom; GLUENZ, Eva. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. In: CLOS, Joachim (org.). **Leishmania**. New York, NY: Springer New York, 2019. (Methods in Molecular Biology). v. 1971, p. 189–210. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9210-2_9. Acesso em: 12 set. 2022.

BOLHASSANI, Azam et al. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 637–645, 2011.

BOUCINHA, Carolina et al. A Stroll Through the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 804707, 2022.

BOY, Romário Lopes et al. Reporter gene systems: A powerful tool for *Leishmania* studies. **Current Research in Microbial Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 100165, 2022.

BRASIL. Brasília, DF, **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Editora MS, 2014. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=d49gAAAAMAAJ>. Acesso em: 22 nov. 2018.

BUCKINGHAM, Lela. **Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications**. [S. l.]: F.A. Davis, 2019.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CALVO-ÁLVAREZ, Estefania et al. Appraisal of a Leishmania major Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both In Vitro and In Vivo Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. e1927, 2012.

CALVO-ÁLVAREZ, Estefanía et al. Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e0003666, 2015.

CARNIELLI, Juliana B. T. et al. A Leishmania infantum genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 36, p. 83–91, 2018.

CASTELLI, Germano et al. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Quantification of Parasite Load by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 865, 2021.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND. **CDC - Leishmaniasis**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 26 mar. 2020.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, [s. l.], v. 263, n. 5148, p. 802–805, 1994.

CHIN YUAN, Chiu; MILEY, Wendell; WATERS, David. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 109–117, 2001.

CHOWDHURY, Rajashree et al. Evaluation of Rapid Extraction Methods Coupled with a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Point-of-Need Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7344569/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

CHRISTINE CLAYTON. **Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/epdf/10.1098/rsob.190072>. Acesso em: 21 ago. 2023.

CLABORN, David M. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 127–134, 2010.

CONTER, Carolina Cella et al. New primers for the detection Leishmania species by multiplex polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 501–511, 2018.

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

CORMAN, Hannah N. et al. Development of a target-free high-throughput screening platform for the discovery of antileishmanial compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 496–501, 2019.

COSTA, Carlos H. N. et al. Asymptomatic human carriers of Leishmania chagasi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 334–337, 2002.

CROFT, Simon L.; YARDLEY, Vanessa. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 319–342, 2002.

DA COSTA, Simone Miranda; CORDEIRO, José Luís Passos; RANGEL, Elizabeth Ferreira. Environmental suitability for Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 11, p. 155, 2018.

DAMASCENO, Jeziel D. et al. DiCre-Based Inducible Gene Expression. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1971, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30980306/>. Acesso em: 7 nov. 2022.

DARIO, Maria Augusta et al. Crithidia mellificae infection in different mammalian species in Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 15, p. 58–69, 2021.

D'AVILA-LEVY, Claudia Masini et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 8, p. 956–965, 2015.

DE ALMEIDA ROCHA, Douglas et al. LutzDex™-A digital key for Brazilian sand flies (Diptera, Phlebotominae) within an Android App. **Zootaxa**, [s. l.], v. 4688, n. 3, p. zootaxa.4688.3.4, 2019.

DE CÁSSIA-PIRES, Renata et al. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e0173922, 2017.

DE OLIVEIRA, Everton Falcão et al. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 178–181, 2017.

DE PAIVA-CAVALCANTI, Milena et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 31, 2015.

DE RUITER, C. M. et al. Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 3147–3155, 2014.

DE SOUSA, Raimundo Leoberto Torres et al. Association between the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* and leishmaniasis incidence in Piauí State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. e0011388, 2023.

DE SOUSA FERREIRA, Tauana et al. High molecular prevalence of *Leishmania* in phlebotomine sand flies fed on chicken blood in Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 259, p. 80–84, 2018.

DEDET, Jean-Pierre; PRATLONG, Francine. *Leishmania*, *Trypanosoma* and Monoxenous *Trypanosomatids* as Emerging Opportunistic Agents¹. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 37–39, 2000.

DIMAIO, John et al. The single mitochondrion of the kinetoplastid parasite *Crithidia fasciculata* is a dynamic network. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. e0202711, 2018.

DIOTALLEVI, Aurora et al. Real-time PCR to differentiate among *Leishmania* (*Viannia*) subgenus, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Application on Brazilian clinical samples. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 201, p. 105178, 2020.

DOUDI, Monir et al. A Study of Genetic Polymorphism of Crithidia in Isfahan, Iran. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 5, 2015. Disponível em: <https://brieflands.com/articles/zjrms-971.html>. Acesso em: 13 jul. 2023.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

DUBE, Anuradha; GUPTA, Reema; SINGH, Nasib. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

EL-SAYED, Najib M. et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 430–442, 2018.

FAKHAR, Mahdi et al. Domestic dogs carriers of Leishmania infantum, Leishmania tropica and Crithidia fasciculata as potential reservoirs for human visceral leishmaniasis in northeastern Iran. **Veterinary Medicine and Science**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2329–2336, 2022.

FAKRUDDIN, Md et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 245–252, 2013.

FERNANDES, Anne C.S. et al. Different secreted phosphatase activities in Leishmania amazonensis. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 340, n. 2, p. 117–128, 2013.

FILGUEIRA, Camila Patricio Braga et al. Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting Leishmania 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. e0008750, 2020.

FREIRE, Mariana Lourenço et al. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. e0007484, 2019.

GALATI, Eunice A. B. et al. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, [s. l.], v. 24, p. 26, 2017.

GHOBAKHLOO, Nafiseh et al. Isolation of *Crithidia* spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 116–126, 2019.

GHOSH, Susmita et al. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 2774–2778, 2012.

GHOSH, Prakash et al. Evaluation of Real-time PCR for Diagnosis of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis in Endemic Foci of Bangladesh. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 10, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176879/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

GHOSH, Prakash et al. Gauging the skin resident *Leishmania* parasites through a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay in post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 18069, 2022.

GONZÁLEZ-DE LA FUENTE, Sandra et al. Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 18050, 2017.

GOSSAGE, Sharon M; ROGERS, Matthew E; BATES, Paul A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOYARD, S. et al. In vivo imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. **Parasitology International**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 260–268, 2014.

GUBBELS, Marc-Jan; STRIEPEN, Boris. Studying the cell biology of apicomplexan parasites using fluorescent proteins. **Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 568–579, 2004.

GUERBOUJ, Souheila et al. Molecular Tools for Understanding Eco-Epidemiology, Diversity and Pathogenesis of *Leishmania* Parasites. In: LEISHMANIASIS - TRENDS IN EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT. [S. l.]: IntechOpen, 2014. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/46299>. Acesso em: 12 ago. 2023.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HAO, Yongxin et al. Optimized expression of dual reporter genes in transient transfection of purified *Toxoplasma gondii* using different promoters. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 483–489, 2012.

HERWALDT, Barbara L. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HOARE, Cecil A.; WALLACE, Franklin G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, [s. l.], v. 212, n. 5068, p. 1385–1386, 1966.

HOMMEL, Marcel. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 101–111, 1999.

HORÁKOVÁ, Eva et al. Catalase compromises the development of the insect and mammalian stages of *Trypanosoma brucei*. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 287, n. 5, p. 964–977, 2020.

HOSSAIN, Faria et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

ISHEMGULOVA, Aygul et al. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362078/>. Acesso em: 20 abr. 2020.

JARA, Marlene et al. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

JARA, Marlene et al. Tracking of quiescence in *Leishmania* by quantifying the expression of GFP in the ribosomal DNA locus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6908629/>. Acesso em: 2 abr. 2020.

KALANTARI, Mohsen et al. Co-detection and isolation of *Leishmania* and *Crithidia* among naturally infected *Tatera indica* (Rodentia: Muridae) in Fars province, southern Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 279, 2018.

KALANTARI, Mohsen et al. DNA-based detection of Leishmania and Crithidia species isolated from humans in cutaneous and post-kala-azar dermal leishmaniasis from Shiraz and Kharameh, southern Iran. **Journal of Vector Borne Diseases**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 52–57, 2020.

KAPLER, G M; COBURN, C M; BEVERLEY, S M. Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1084–1094, 1990.

KAUFER, Alexa et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 287, 2017.

KESSLER, Rafael Luis et al. Stage-regulated GFP Expression in Trypanosoma cruzi: applications from host-parasite interactions to drug screening. **PloS One**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e67441, 2013.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

KOSTYGOV, Alexei Y. et al. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 200407, 2021.

KRAEVA, Natalya et al. Catalase in Leishmaniinae: With me or against me?. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 50, p. 121–127, 2017.

KRAEVA, Natalya et al. Leptomonas seymouri: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with Leishmania donovani. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. e1005127, 2015.

LANG, Thierry et al. Bioluminescent Leishmania expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboured macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 383–392, 2005.

LANG, Thierry; LECOEUR, Hervé; PRINA, Eric. Imaging Leishmania development in their host cells. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 464–473, 2009.

LINS, R. M. M. A. et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 117–122, 2002.

LUKEŠ, Julius et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 195, n. 2, Special Issue on the 35th Anniversary of Molecular and Biochemical Parasitology, p. 115–122, 2014.

LUZ, Z. M. et al. [Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 143–148, 1994.

MARUYAMA, Sandra R. et al. Non-Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil - Volume 25, Number 11—November 2019 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s. l.], 2019. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/11/18-1548_article. Acesso em: 29 mar. 2020.

MASLOV, Dmitri A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 43–52, 2013.

MAXFIELD, Luke; CRANE, Jonathan S. **Leishmaniasis**. [S. l.]: StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/>. Acesso em: 14 dez. 2022.

MCGHEE, R. Barclay. The Infection of Avian Embryos with *Crithidia* Species and *Leishmania Tarentola*. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 18–25, 1959.

MCGHEE, R B; COSGROVE, W B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 140–173, 1980.

MIKHAIL V. MATZ. **Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species | Nature Biotechnology**. [S. l.], 1999. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nbt1099_969. Acesso em: 22 ago. 2023.

MIRZAPOUR, Aliyar et al. Super Infection of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major* and *L. tropica* to *Crithidia fasciculata* in Shiraz, Iran. **Iranian Journal of Public Health**, [s. l.], v. 48, n. 12, p. 2285–2292, 2019.

MISHRA, Jyotsna; SAXENA, Anubha; SINGH, Sarman. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1153–1169, 2007.

MISSLITZ, Ana et al. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 251–261, 2000.

MONDAL, Dinesh et al. Quantifying the Infectiousness of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Toward Sand Flies. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 251–258, 2019.

MOREIRA, Nádia das Dores et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 181, 2016.

MULE, Simon Ngao et al. **Leishmaniinae: evolutionary inferences based on protein expression profiles (PhyloQuant) congruent with phylogenetic relationships among *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Porcisia*, *Zelonia*, *Crithidia*, and *Leptomonas***. [S. l.]: bioRxiv, 2023. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.09.22.558958v1>. Acesso em: 3 nov. 2023.

NANDI, Srabani; SARKAR, Dwijen. Partial purification and characterization of a soluble protein phosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 148, n. 2, p. 191–198, 1995.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 749–757, 1999.

NETTO, Georges J.; SAAD, Rana. Diagnostic molecular pathology, part 2: Proteomics and clinical applications of molecular diagnostics in hematopathology. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 7–12, 2005.

NETTO, George J.; SAAD, Rana D.; DYSERT, Peter A. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 379–383, 2003.

NICK DOWNEY. **Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis | IDT**. [S. l.], 2014. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>. Acesso em: 19 jul. 2023.

NOVY, Frederick G.; MCNEAL, Ward J. On the Cultivation of *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–30, 1904.

NOYES, H.a et al. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia¹. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 331–339, 1999.

NZELU, Chukwunonso O.; KATO, Hirotomo; PETERS, Nathan C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019.

PAHO/WHO | PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. N° 11 (Dezembro de 2022) - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. [S. l.], 2022a. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>. Acesso em: 11 ago. 2023.

PAHO/WHO | PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. [S. l.], 2022b. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 11 ago. 2023.

PAIVA-CAVALCANTI, M; REGIS-DA-SILVA, Cg; GOMES, Ym. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição**. [S. l.]: Pan American Health Organization, 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56487>. Acesso em: 11 ago. 2023.

PASION, Sally G et al. Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle. [s. l.], p. 6, 1994.

PEACOCK, Christopher S et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PEREIRA, Loren Queli et al. Identification of Leishmania infantum in blood donors from endemic regions for visceral leishmaniasis. **Parasitology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 110–114, 2021.

POTTER, Huntington. Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 361–373, 1988.

PRASHER, D. C. et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. **Gene**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 229–233, 1992.

PRINA, Eric et al. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1307–1315, 2007.

PULIDO, Sergio A. et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in Leishmania spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 36–45, 2012.

RASHID, A. K. M. Mamunur. Diagnosis of Leishmaniasis in Children. In: LEISHMANIASIS - TRENDS IN EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT. [S. l.]: IntechOpen, 2014. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/46256>. Acesso em: 11 ago. 2023.

REIMÃO, Juliana Quero et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

REINA, Adelys M. et al. Characterization of Leishmania spp. Causing Cutaneous Lesions with a Negative Parasitological Diagnosis in Panama. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 282, 2022.

REIS, Levi Eduardo Soares et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural Leishmania infantum infection. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 197, n. 3, p. 498–503, 2013.

REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

REZAEI, Zahra et al. Leishmania ITS1 Is Genetically Divergent in Asymptomatic and Symptomatic Visceral Leishmaniasis: Results of a Study in Southern Iran. **Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 2020, p. 5351098, 2020.

ROBERT V. THURSTON, Martin A. Hamilton. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays | Environmental Science & Technology**. [S. l.], 1977. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60130a004>. Acesso em: 30 abr. 2021.

ROCHA, Douglas de Almeida; ANDRADE, Andrey José de; DE ALMEIDA, Maxwell Ramos. **LUTZODEXTM – a digital key for sand flies (Diptera: Phlebotominae) using Android App**.

[S. I.], 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/project/LUTZODEXTM-a-digital-key-for-sand-flies-Diptera-Phlebotominae-using-Android-App>. Acesso em: 1 abr. 2022.

RODRIGUEZ, Anabel Elisa et al. Leishmania. In: FLORIN-CHRISTENSEN, Monica; SCHNITTGER, Leonhard (org.). **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 289–311. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_13. Acesso em: 4 maio 2021.

ROGERIO, Luana Aparecida et al. Co-infection of Leishmania infantum and a Crithidia-related species in a case of refractory relapsed visceral leishmaniasis with non-ulcerated cutaneous manifestation in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 0, n. 0, 2023. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(23\)00563-5/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(23)00563-5/fulltext). Acesso em: 15 maio 2023.

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

ROITMAN, Isaac et al. Growth of Crithidia at High Temperature: Crithidia hutneri sp. n. and Crithidia luciliae thermophila s. sp. n.*. **The Journal of Protozoology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 553–556, 1977.

SADEGHI, Somayeh et al. In Vitro Infectivity Assessment by Drug Susceptibility Comparison of Recombinant Leishmania major Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein or EGFP-Luciferase Fused Genes with Wild-Type Parasite. **The Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 385–394, 2015.

SALEHI, Nasrin; PENG, Ching-An. Gene transfection of Toxoplasma gondii using PEI/DNA polyplexes. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 133–137, 2012.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 441–448, 1975.

SCHÖNIAN, Gabriele et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples¹¹Part of this work has been presented at the Second World Congress on Leishmaniasis in Crete, Greece, May 2001. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003.

SEAN HA, D. et al. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 57–64, 1996.

SHAHNAZ, Gul et al. Crossing Biological Barriers for Leishmaniasis Therapy: From Nanomedicinal Targeting Perspective. In: LEISHMANIASIS AS RE-EMERGING DISEASES. [S. l.]: IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/61799>. Acesso em: 11 ago. 2023.

SHANER, Nathan C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1567–1572, 2004.

SHEIKH, Salwa S. et al. Leishmaniasis. In: PARASITOLOGY AND MICROBIOLOGY RESEARCH. [S. l.]: IntechOpen, 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/70698>. Acesso em: 10 ago. 2023.

SILVA, João Batista Tavares Da; ROITMAN, Isaac. Effect of Temperature and Osmolarity on Growth of *Crithidia fasciculata*, *C. hutneri*, *C. luciliae thermophila*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. **The Journal of Protozoology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 269–272, 1982.

SIMPSON, Alastair G. B.; STEVENS, Jamie R.; LUKEŠ, Julius. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.

SINGH, Nasib et al. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 370–374, 2009.

SINGH, Neeloo; CHIKARA, Surendra; SUNDAR, Shyam. SOLiD™ Sequencing of Genomes of Clinical Isolates of *Leishmania donovani* from India Confirm *Leptomonas* Co-Infection and Raise Some Key Questions. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e55738, 2013.

SONGUMPAL, Nopporn et al. First Evidence of Co-Circulation of Emerging *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* sp. in *Culicoides* Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae), the Putative Vectors for Autochthonous Transmission in Southern Thailand. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 379, 2022.

SRIVASTAVA, Pankaj et al. Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1145–1150, 2010.

SRIVASTAVA, Pankaj et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 1–6, 2011.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUDARSHAN, Medhavi; SUNDAR, Shyam. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 40–42, 2014.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.

TAHERI, T; ESKANDAR, M; RAFATI, S. Production of Recombinant Leishmania Tropica Parasites Expressing Two Proteins of Egfp and Luciferase Reporter. [s. l.], p. 7, 2017.

TAKAHASHI. **TRIAGEM DE ISOLADOS CLÍNICOS DE Leishmania sp. PARA SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.** [S. l.], 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/8195/browse?type=author&value=Takahashi%2C+Talita+Yuri>. Acesso em: 30 abr. 2021.

TAKAMIYA, Nayore Tamie et al. Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of Leishmania infantum and Crithidia. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 405, 2023.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 512–526, 1993.

THAKUR, Lovlesh et al. Leptomonas seymouri Co-infection in Cutaneous Leishmaniasis Cases Caused by Leishmania donovani From Himachal Pradesh, India. **Frontiers in Cellular**

and Infection Microbiology, [s. l.], v. 10, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00345/full>. Acesso em: 22 jul. 2020.

TSOKANA, Constantina N. et al. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/molecular-diagnosis-of-leishmaniasis-species-identification-and-phylogenetic-analysis>. Acesso em: 22 maio 2020.

ULIANA, Silvia R. B.; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 464–480, 2018.

VALERIANO, Karoline Camila. **Avaliação dos desfechos de infecção in vitro e em modelo experimental no hamster com diferentes isolados clínicos de Leishmania infantum**. 2022. Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-08082022-090326/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

VALLUR, Aarthy C. et al. Biomarkers for Intracellular Pathogens: Establishing tools as Vaccine and Therapeutic Endpoints for Visceral Leishmaniasis. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. O374–O383, 2014.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 33, n. 1, Updates in Tropical Medicine, p. 79–99, 2019.

VENKATARAMAN, Arvind et al. Spike-in genomic DNA for validating performance of metagenomics workflows. **BioTechniques**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 315–321, 2018.

VERMA, Sandeep et al. Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10107, 2010.

VERMELHO, Alane Beatriz et al. Leishmaniasis: Possible New Strategies for Treatment. In: LEISHMANIASIS - TRENDS IN EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT. [S. l.]: IntechOpen, 2014. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/46399>. Acesso em: 11 ago. 2023.

VIOTI, Geovanna et al. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], 2021.

VOTÝPKA, Jan et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015.

WALLACE, F. G. Flagellate Parasites of Mosquitoes with Special Reference to *Crithidia fasciculata* Léger, 1902. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 196–205, 1943.

WANGER, Audrey et al. Chapter 12 - Overview of Molecular Diagnostics Principles. In: WANGER, Audrey et al. (org.). **Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 233–257. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053515000120>. Acesso em: 24 maio 2020.

WEIRATHER, Jason L. et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 11, p. 3892–3904, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. Geneva, p. 20, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Leishmaniasis**. [S. l.], 2023. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em: 23 mar. 2020.

YE, Jian et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 13, p. 134, 2012.

YURCHENKO, Vyacheslav; BUTENKO, Anzhelika; KOSTYGOV, Alexei Y. Genomics of Trypanosomatidae: Where We Stand and What Needs to Be Done?. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1124, 2021.

ZAMPIERI, Ricardo Andrade et al. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e0004485, 2016.

ZORGI, Nahiara Esteves et al. *Leishmania infantum* transfected with toxic plasmid induces protection in mice infected with wild type *L. infantum* or *L. amazonensis*. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 127, p. 95–106, 2020.

APÊNDICE

8. Apêndice

Apêndice 1

Diluição seriada para curva padrão qPCR de acordo com o cálculo da massa de DNA equivalente a um parasito de *L. infantum*.

# Parasites	Required mass of parasite DNA (g)	Final concentration of the parasite (g/uL)
10^6	81.5 e-09	40.7 e-09
10^5	81.5 e-10	40.7 e-10
10^4	81.5 e-11	40.7 e-11
10^3	81.5 e-12	40.7 e-12
10^2	81.5 e-13	40.7 e-13
10^1	81.5 e-14	40.7 e-14
10^0	81.5 e-15	40.7 e-15

Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

Dilution	Parasite DNA for dilution	[] initial g/uL C1	DNA volume V1	Dilution volume	Final volum eV2	[] final g/uL C2	Estimate of the number of parasites in 2 uL
1	Stock					40.7 e-09	10^6
2	Tube 1	40.7 e-09	10	90	100	40.7 e-10	10^5
3	Tube 2	40.7 e-10	10	90	100	40.7 e-11	10^4
4	Tube 3	40.7 e-11	10	90	100	40.7 e-12	10^3
5	Tube 4	40.7 e-12	10	90	100	40.7 e-13	10^2
6	Tube 5	40.7 e-13	10	90	100	40.7 e-14	10^1
7	Tube 6	40.7 e-14	10	90	100	40.7 e-15	10^0

Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

Diluição seriada para curva padrão qPCR de acordo com o cálculo da massa de DNA equivalente a um parasito de *Crithidia sp* LVH-60A.

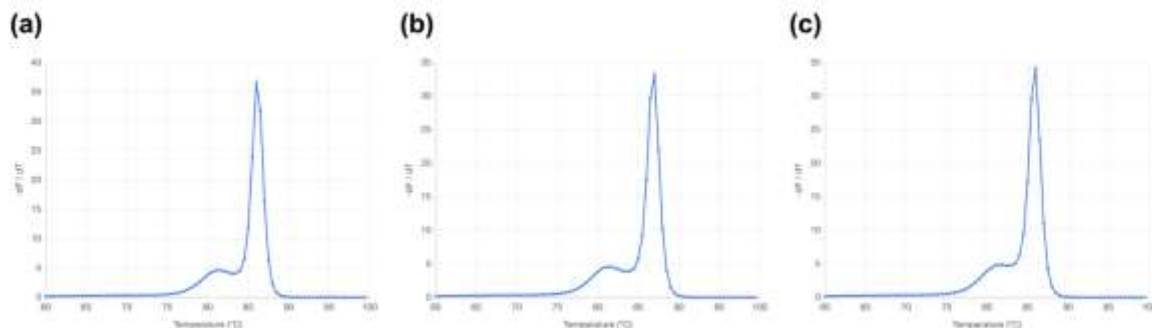
# Parasites		Required mass of parasite DNA (g)		Final concentration of the parasite (g/uL)
10 ⁶		87.3 e-09		43.6 e-09
10 ⁵		87.3 e-10		43.6 e-10
10 ⁴	x 87.3 e-15g	87.3 e-11	/ 2μL	43.6 e-11
10 ³		87.3 e-12		43.6 e-12
10 ²		87.3 e-13		43.6 e-13
10 ¹		87.3 e-14		43.6 e-14
10 ⁰		87.3 e-15		43.6 e-15

Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

Dilution	Parasite DNA for dilution	[] initial g/uL C1	DNA volum eV1	Dilution volume	Final volum eV2	[] final g/uL C2	Estimate of the number of parasites in 2 uL
1	Stock					43.6 e-09	10 ⁶
2	Tube 1	43.6 e-09	10	90	100	43.6 e-10	10 ⁵
3	Tube 2	43.6 e-10	10	90	100	43.6 e-11	10 ⁴
4	Tube 3	43.6 e-11	10	90	100	43.6 e-12	10 ³
5	Tube 4	43.6 e-12	10	90	100	43.6 e-13	10 ²
6	Tube 5	43.6 e-13	10	90	100	43.6 e-14	10 ¹
7	Tube 6	43.6 e-14	10	90	100	43.6 e-15	10 ⁰

Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

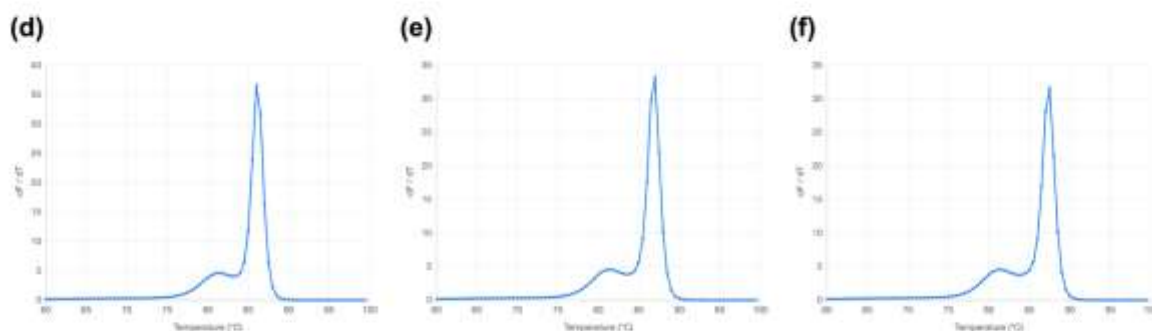
Apêndice 2: Previsão da curva de fusão uMelt de produtos qPCR usando *primers* Catalase_LVH60-12060_1F.



(a) **LVH60aC1 36**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAAT**CGGGCC**ACAGACAACCGTTTTCT**CGCGGG**AAT**CCCCGCCG**ACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCC
ACCTTATTCG

(b) **LVH60aC1 05**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAAT**CGGGCC**ACAGACAACCGTTTTCT**CGCGGG**ACT**CCCCGCCG**ACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCC
ACCTTATTCG

(c) **LVH60aC1 10**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAATCT**GCC**ACAGACAACCGTTTTCT**CGCGGG**ACT**CCCCGC**TGACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCC
ACCTTATTCG



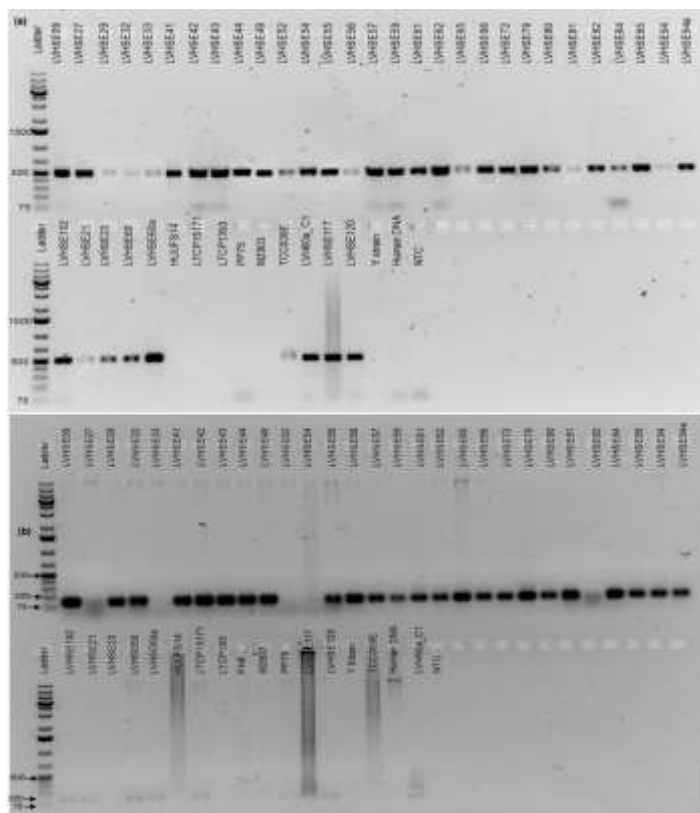
(d) **CfaC1 28**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAAT**CGGGCC**ACAGACAACCGTTTTCT**CGCGGG**AAT**CCCCGCCG**ACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCCA
CCCTTATTCG

(e) **CfaC1 29**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAAT**CGGGCC**ACAGACAACCGTTTTCT**CGCGGG**ACT**CCCCGCCG**ACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCC
ACCTTATTCG

(f) **CfaC1 16**
TCAGCGAGTCGGAGATCTAAT**CGGGCC**ACAGACATCCGTGTTCT**CGCGGG**ACT**CCCCGCCG**ACGCAGTGAT**GCGCC**ATCTATTCTCTTTGTTTCC
ACCTTATTCG

Predição da curva de dissociação por *uMelt* de produtos qPCR usando *primers* Catalase_LVH60-12060_1F: análise *in silico* de possíveis amplicons qPCR de 107 pb de cópias do gene catalase de *Crithidia* sp LVH60A (a- c) e *C. fasciculata* (TCC039E) (d- f). As regiões ricas em GC estão em negrito nas sequências de amplicon.

Apêndice 3: Eletroforese em gel de agarose (1%) das amplificações com Crid2.1seq e *primer* LVH60a_Tig001.



(a) Ensaio de PCR convencional realizado com DNA de isolados clínicos (~100 ng) com *primer* Crid2.1seq, específico para *Crithidia* spp. (b) Ensaio de PCR convencional realizado com DNA de isolados clínicos (~100 ng) com *primer* LVH60a_Tig001, específico para *Crithidia* sp LVH60A. Ambos os ensaios foram usados amostras de DNA do hospedeiro (humano), HUUFS14 e PP75 (*L. infantum*), LTCP393, LTCP15171 e M2903 (*L. braziliensis*), PH8 (*L. amazonensis*) TCC039E (*C. fasciculata*) também foram testadas. NTC: sem controle de modelo. As imagens foram capturadas por ChemiDoc™ XRS Systems (Bio-Rad) e utilizado o software Image Lab. Ladder GeneRuler 1Kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific). Fonte: Figura reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

Apêndice 4: Resultados de PCR com *primers* espécie-específicos e tipagem molecular por sequenciamento de Sanger das amostras de pacientes LV.

Amostras	Tecido	SSU rRNA (18S)	PCR Linj31Seq	PCR Crid2.1Seq	Isolado Clínico (ID)
BM.LV1	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE09
BM.LV2	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE27
BM.LV4	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE32
BM.LV5	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE43
BM.LV6	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE52
BM.LV7	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE54
BM.LV8	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	No
BM.LV10	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE59
BM.LV11	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE61
BM.LV12	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE62
BM.LV15	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE49
BM.LV16	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE50
BM.LV17	Medula óssea	#	P	NA	No
BMLV 60*	Medula óssea	<i>Crithidia</i> sp. LVH-60A	N	NA	LVHSE60
GSJ	Medula óssea	<i>Crithidia</i> sp. LVH-60A	NP	NA	LVHSE14 8
JFJ	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	NP	NA	No
LBV	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	NP	NA	No
AV	Medula óssea	<i>L. infantum</i>	NP	NA	No
P13D0*	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE60
P11D0	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	No
P12D0	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	No
P16D0	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	LVHSE101
P23D0+7+1 4	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	No
P37D	Sangue periférico	#	N	NA	No
P39D	Sangue periférico	<i>L. infantum</i>	P	NA	No

*Paciente recidivo (estudo de Maruyama *et al.* 2019); #: TRY927/SSU561 sequenciamento de baixa qualidade; P: PCR positivo; N: PCR negativo; NP: Não realizado; NA: não compatível com tamanho de banda *amplicon*; ID: identificação isolada LVHSE. Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023)

Apêndice 5: Tabela de resultados de PCR com os *primers* LinJ31seq e Crid2.1seq.

A coluna TRY/SSU exibe a tipagem molecular por análise de *amplicon* (sequenciamento de Sanger) de isolados clínicos.

Isolados clínicos	Tecido de origem	PCR		TRY927/SSU561
		LinJ31Seq	Crid2.1Seq	
L VHSE09 ^a	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE21	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE23 ^a	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE27	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE29	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE32	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE33	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE41	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE43 ^a	Medula óssea	N	p#	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE44	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE49	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE52	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE54	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE55	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE56	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE57	Medula óssea	P	p#	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE59	Medula óssea	P	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE61	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE62	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE65	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE66	Medula óssea	P	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE72	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE79	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE80	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE81	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE82	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE84	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE85	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE94	Medula óssea	N	p#	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE94 ^a	Pele	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE101 ^a	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE103	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE105	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE107	Medula óssea	N	P	*
L VHSE109	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE110	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE115	Medula óssea	P	N	*
L VHSE117 ^b	Medula óssea	P	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE119	Medula óssea	P	N	<i>L. infantum</i>
L VHSE120 ^b	Baço	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE132	Medula óssea	P	N	*
L VHSE133	Medula óssea	P	N	<i>L. infantum</i>
L VHSE134	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE135	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE137	Medula óssea	N	P	*
L VHSE138	Medula óssea	N	P	*
L VHSE139	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE140	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE141	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE142	Medula óssea	N	P	*
L VHSE146	Medula óssea	N	P	*
L VHSE148	Medula óssea	N	P	*
L VHSE149	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
L VHSE153	Medula óssea	p#	N	*
L VHSE159	Medula óssea	p#	N	*
L VHSE160	Medula óssea	p#	N	<i>L. infantum</i>

LVHSE161 ^{b#}	Medula óssea	P	N	<i>L. infantum</i>
LVHSE162	Medula óssea	P	N	*
LVHSE161a_N1 ^{b#}	Nódulo de pele	P	N	<i>L. infantum</i>
LVHSE161a_N2 ^{b#}	Nódulo de pele	P	N	<i>L. infantum</i>
LVHSE60**	Medula óssea	N	P	<i>Crithidia sp</i>
LVHSE60a**	Pápula de pele	N	P	<i>Crithidia sp</i>

*Sequência de má qualidade. isolado de paciente com recaída. ^bIsolado do mesmo paciente no ano de 2017 (estudo de Rogério *et al.* 2023) (números de acesso OQ581230.1 e OQ581233.1); ^{b#}Paciente recidivante no ano de 2020 (mesmo paciente do isolado clínico LVHSE117, estudo de Rogério *et al.* 2023) (números de acesso OQ581236.1 e OQ581240.1). **Paciente com recaída (estudo de Maruyama *et al.* 2019) (número de acesso OQ581229.1 e OQ581228.1. Tabela reproduzido do trabalho de (Takamiya *et al.*, 2023).

9. Anexo

Artigo publicado em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080405>

Tropical Medicine and Infectious Disease



Article

Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of *Leishmania infantum* and *Crithidia*

Nayore Tamie Takamiya ¹ , Luana Aparecida Rogerio ¹ , Caroline Torres ¹ , João Augusto Franco Leonel ² , Geovanna Vioti ² , Tricia Maria Ferreira de Sousa Oliveira ^{2,3} , Karoline Camila Valeriano ⁴ , Gabriane Nascimento Porcino ⁴ , Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos ⁴ , Carlos H. N. Costa ⁵ , Dorcas Lamounier Costa ⁵ , Tauana Sousa Ferreira ⁶ , Rodrigo Gurgel-Gonçalves ⁶ , João Santana da Silva ⁷ , Felipe Roberti Teixeira ¹ , Roque Pacheco De Almeida ⁸ , José M. C. Ribeiro ⁹ and Sandra Regina Maruyama ^{1,*}



Citation: Takamiya, N.T.; Rogerio, L.A.; Torres, C.; Leonel, J.A.F.; Vioti, G.; de Sousa Oliveira, T.M.F.; Valeriano, K.C.; Porcino, G.N.; de Miranda Santos, I.K.F.; Costa, C.H.N.; et al. Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of *Leishmania infantum* and *Crithidia*. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 405. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080405>

Academic Editor: Brice Rotureau

Received: 3 July 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 31 July 2023

Published: 8 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Department of Genetics and Evolution, Center for Biological Sciences and Health, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos 13565-905, SP, Brazil; nayoretakamiya@estudante.ufscar.br (N.T.T.); frt@ufscar.br (F.R.T.)

² Post-Graduate Program in Experimental Epidemiology Applied to Zoonoses at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-270, SP, Brazil

³ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga 13635-900, SP, Brazil

⁴ Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, FMRP-USP, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil

⁵ Natan Portela Institute of Tropical Diseases, Teresina 64002-510, PI, Brazil

⁶ Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil

⁷ Fiocruz-Bi-Institutional Translational Medicine Project, Oswaldo Cruz Foundation, Ribeirão Preto 14040-900, SP, Brazil

⁸ Department of Medicine, Center for Biology and Health Sciences, Federal University of Sergipe (UFS), Aracaju 49060-108, SE, Brazil

⁹ National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, NIH/NIAID, Rockville, MD 20892, USA

* Correspondence: sandrarcm@ufscar.br

Abstract: Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease considered a serious public health problem, especially in endemic countries. Several studies have discovered monoxenous trypanosomatids (*Leptomonas* and *Crithidia*) in patients with VL. In different situations of leishmaniasis, investigations have examined cases of co-infection between *Leishmania* spp. and *Crithidia* spp. These coinfections have been observed in a wide range of vertebrate hosts, indicating that they are not rare. Diagnostic techniques require improvements and more robust tools to accurately detect the causative agent of VL. This study aimed to develop a real-time quantitative dye-based PCR (qPCR) assay capable of distinguishing *Leishmania infantum* from *Crithidia*-related species and to estimate the parasite load in samples of VL from humans and animals. The primer LinJ31_2420 targets an exclusive phosphatase of *L. infantum*; the primer Catalase_LVH60-12060_1F targets the catalase gene of *Crithidia*. Therefore, primers were designed to detect *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A (a novel trypanosomatid isolated from VL patients in Brazil), in samples related to VL. These primers were considered species-specific, based on sequence analysis using genome data retrieved from the TriTryp database and the genome assembling of *Crithidia* sp. LVH60A strain, in addition to experimental and clinical data presented herein. This novel qPCR assay was highly accurate in identifying and quantifying *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A in

samples obtained experimentally (in vitro and in vivo) or collected from hosts (humans, dogs, cats, and vectors). Importantly, the screening of 62 cultured isolates from VL patients using

these primers surprisingly revealed that 51 parasite cultures were PCR+ for *Crithidia* sp. In addition, qPCR assays identified the co-infection of *L. infantum* with *Crithidia* sp. LVH60A in two new VL cases in Brazil, confirming the suspicion of co-infection in a previously reported case of fatal VL. We believe that the species-specific genes targeted in this study can be helpful for the molecular diagnosis of VL, as well as for elucidating suspected co-infections with monoxenous-like trypanosomatids, which is a neglected fact of a neglected disease.

Keywords: visceral leishmaniasis; molecular diagnosis; quantitative PCR (qPCR); *Crithidia* sp.LVH60A; *Leishmania infantum*; trypanosomatid co-infection

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease and is considered an important public health problem caused by the protozoan *Leishmania*. More than 20 species of this genus are known to infect humans and other mammals, and are transmitted to vertebrate hosts by infected phlebotomine sandflies [1–3]. The most severe form of the disease is visceral leishmaniasis (VL) due to systemic infection that affects internal organs, such as the spleen, bone marrow, liver, and lymph nodes. It may be fatal when not properly treated [4]. Thirteen countries have been recorded as endemic for VL, including several in East Africa, South Asia, and America, including Brazil, which accounts for 93% of the cases [5]. In Brazil, the etiological agent for VL is *Leishmania infantum* (synonym *L. chagasi*) [1]. VL symptomatology ranges from asymptomatic to mild or oligosymptomatic, up to severe outcomes [5]. Infection by *L. infantum* triggers immunopathological processes that have been elucidated by large-scale gene expression studies [6,7]. Acute infection in symptomatic VL patients has elicited pathways related to interferons (IFN- γ and IFN- β) and neutrophil responses, but interestingly, even asymptomatic individuals with an undetected parasite load have presented considerable molecular disturbance in the gene expression pattern of leukocytes. In addition, long non-coding RNAs (lncRNAs) may act as regulators of immune responses [7].

For the treatment of VL, chemotherapy is administered using liposomal amphotericin B, pentavalent antimonial, and amphotericin B deoxycholate. Another factor to consider is the development of drug resistance by the parasite, mainly because of the failure to accurately identify the etiological agent at the time of diagnosis [8–10]. Early diagnosis is of fundamental importance to direct the most appropriate treatment, avoid worsening and progression of the clinical condition, and consequently, reduce mortality in patients with VL [9]. The development of molecular tools has provided complementary and alternative techniques for the diagnosis of VL in research laboratories, particularly in cases of active infection or when conventional diagnoses (parasitological, myelogram, and serological) yield inconclusive results, such as in asymptomatic patients [9,11]. Molecular techniques are reliable due to their high sensitivity and specificity. Among them, we highlight those based on nucleic acid amplification, such as PCR (and its variations) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Studies have shown that the LAMP assay is promising for the detection of *Leishmania* parasites in tissues and blood [12–14]. However, PCR and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) are the most commonly used methods for parasite detection. qPCR can detect and measure parasitic load during treatment, assess possible therapeutic failures, and monitor relapse cases. It can also support the screening of asymptomatic individuals because maintenance of the disease involves the circulation of anthrozoönotic reservoirs (domestic animals and humans). Therefore, this molecular tool is essential for both the diagnosis and furthering the understanding of epidemiology in endemic regions [15–17].

Cases of co-infection between *Leishmania* spp. and *Crithidia* spp. have been recorded in several vertebrate hosts, including rodents, as reported by Kalantari et al. [18], and humans, as reviewed by Boucinha et al. [19]. The presence of *Crithidia* parasites in patients with cutaneous leishmaniasis from different parts of Iran showed the presence of co-infections (observed by the isolation of *Crithidia* sp. from lesions), in addition to superinfection by different species of *Leishmania* [19–23]. The coexistence of *L. infantum* and *Crithidia* spp. in a patient with relapsed visceral leishmaniasis (VL) and nodular cutaneous manifestation, as reported in a case study by Rogerio et al. [24], implies that the co-infection scenario is associated with an atypical clinical presentation. Fakhar et al. [25] reported the occurrence of *Leishmania* spp. and *Crithidia* spp. in dogs in northeastern Iran in the context of co-

infection in reservoir animals. Dario et al. [26] also described the occurrence of *Crithidia* infection in numerous mammalian species in Brazil. Another study found *Culicoides* mosquitoes to be potential vectors of *Leishmania* and *Crithidia* transmission in southern Thailand [27]. All of these studies provide context for various aspects of *Crithidia* within the spectrum of leishmaniasis, raising concerns about the impact of *Crithidia* infection in epidemiology, on clinical manifestations and resistance to treatments.

The present study describes a dye-based real-time quantitative PCR assay that utilizes two new specific targets to discriminate the species responsible for VL in Brazil (*L. infantum*) from other non-*Leishmania* species such as *Crithidia* sp., which can also be found in patients with VL [19,20,24,28]. The primer set for *L. infantum* was specifically designed for the LinJ31_2420 gene, which encodes the putative p-nitrophenylphosphatase enzyme belonging to the phosphatase family. This gene might be involved in biological processes such as phosphate metabolism, signal transduction, and nucleic acid synthesis [29,30]. The other target is the catalase gene, found only in monoxenous trypanosomatids [31,32]. In this context, we standardized and validated both targets for the detection and estimation of parasite load in tissues of VL patients, cultured parasites isolated from VL patients, domestic animal hosts (dogs and cats), samples from experimental infections (humans and hamsters), phlebotomine samples, and samples of an atypical and fatal case reported by Maruyama et al. [28]. These new targets can assist in the diagnosis of VL at research centers and in epidemiological surveillance within endemic areas of the disease. Furthermore, we provide novel molecular detection assays for parasite identification using qPCR, which can discriminate co-infections with other monoxenous trypanosomatid parasites, such as *Crithidia*-related species, reports of which have increased recently in humans [19,20,24,33–36].

Material and Methods

1.1. Search Strategy for New Gene Targets and Primer Design

Unique genes for *Leishmania* species were first retrieved from the genome analyses performed by Rogers et al. [37]. Target genes were reanalyzed using the search strategy tool available on TriTrypDB [38], in which search operations (intersect and/or minus) used BLASTN and Orthology (OrthoMCL algorithm) to combine results and retrieve information. The primer sets designed for *L. infantum* were based on the LinJ31_2420 gene (NCBI Reference Sequence: XM_001467522.1) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM_001467522.1; accessed on 26 July 2023). Primer sets for *Crithidia* sp. LVH60A were designed using genome assembly (GenBank assembly GCA_003671345.1). Oligonucleotides for targeted sequences were designed using the Primer-Blast tool [39], specifically checking parameters using the genomes of hosts (human, taxid:9609; dog, taxid:9615; cat, taxid:9685; rodents, taxid:9989). Primer specifications are listed in Table 1.

The sequences of catalase genes for *C. fasciculata* (reference CfCl) and the LinJ31_2420 gene by *L. infantum* (reference JPCM5) and *Leishmania* spp. were obtained from the TriTrypDB database [38]. Catalase genes for *Crithidia* sp. LVH60A were retrieved using local BLASTN searches (BLAST+ executables downloaded from NCBI). Additionally, BLASTN searches using amplicon and sequence primers were performed locally against downloaded genome sequences of *Crithidia* sp. LVH60A (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_030078075.1/, accessed on 25 May 2023), *C. fasciculata* reference Cf-Cl (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_000331325.2/; accessed on 22 October 2022), *L. infantum* reference JPCM5, Genome assembly ASM287v2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002875.2/; accessed on 22 October 2022), and *L. infantum* HUUFS14 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_003671315.1/; accessed on 22 October 2022) with default parameters. Sequence searches using amplicon and sequence primers against other Leishmaniinae species were performed using BLASTN, available in TriTrypDB resources.

Table 1. General information about primers.

Primer Name	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Amplicon Size	Usage
GTGCACGCCAA-TGTCTTTGT <i>LinJ31seq</i>		GCCCATGGTT- GAGCTAGGTT	444 bp	Detection of <i>L. infantum</i> by PCR
LinJ31_2420	GCAGCGATGC- GACCTAGTT	TGTACAAGGC- ACTGGCGTAG	98 bp	Detection and quantification of <i>L. infantum</i> by qPCR
TCACTTTGGC-GGTATCAGTG <i>Crith2.Iseq</i>		GCATCAGCTGA- CCCTTTCTC	502 bp	Detection of <i>Crithidia</i> sp. LVH60A and <i>C. fasciculata</i> by PCR
LVH60a_Tig001	GTTAGAGCGAC- TAGCCCGT	GGGTAGAGGA- GAGAGGTGGG	128 bp	Detection of <i>Crithidia</i> sp. LVH60A by PCR
Catalase_LVH60- 12060_1F	TCAGCGAGTC- GGAGTCTAA	CGAATAAGGGTG- GAAACAAAGAG	107 bp	Detection and quantification of <i>Crithidia</i> sp. LVH60A and <i>C. fasciculata</i> by qPCR

F, forward; R, reverse; bp, base pair.

1.2. DNA Extraction

Tissue DNA extraction was performed using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations for the patients' bone marrow and peripheral blood, as well as for the spleen and liver samples of dogs and hamsters. The genomic DNA from bone marrow aspirates and peripheral blood of cats with VL was obtained in a study by Vioti et al. [40] performed in the municipality of Ilha Solteira, São Paulo, Brazil, between 2015 and 2019.

Genomic DNA of the parasite cultures was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations after 6–8 days (approximately 10⁷ parasites) for all parasite species. *Leishmania* strains (*L. infantum*: WHO/MHOM/BR/74/PP75 and HUUF514; *L. amazonensis*: MHOM/BR/1973/M2269 and IFLA/BR/67/PH8; *L. braziliensis*: MHOM/BR/75/M2903, LTCP15171, and LTCP393) were maintained in vitro in Schneider's Drosophila medium (Gibco™, Paisley, SC, UK) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin–streptomycin–glutamine (Gibco™, Carlsbad, CA, USA), 2% filtered male urine, and a final volume adjusted with incomplete Schneider's Drosophila medium and incubated at 27 °C for 4–9 days for growth. *Crithidia* sp. isolates (LVH60_C3—clone 3; LVH117_C1—clone 1; and LVH120_C5—clone 5) were maintained in Schneider's Drosophila medium supplemented with 10% FBS in an incubator at 25–27 °C for 4–7 days for growth. Trypomastigote *T. cruzi* (Y strain) culture was maintained in Novy–MacNeal–Nicolle medium [41] with liver infusion tryptose medium (LIT) [42] in an incubator at 27 °C for 7 days. Choanomastigote culture of *Crithidia fasciculata* (TCC039E strain) was maintained in Schneider's Drosophila medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin–glutamine (Gibco™, Carlsbad, CA, USA) in an incubator at 27 °C for 4–7 days. No difference in DNA extraction efficacy was observed, regardless of the parasite species or strain used.

DNA was extracted after in vitro infection using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). In vitro infection assays were performed on THP-1 monocytes (a human cell line derived from acute monocytic leukemia), as described in Section 2.5.1. THP-1 cells were maintained in culture flasks (5 mL of complete RPMI 1640 with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin–glutamine, Gibco™, Carlsbad, CA, USA), and the medium was changed every two days and maintained in an incubator at 37 °C and 5% CO₂. For cell differentiation, monocytes were treated with 0.1 μM PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ to induce differentiation into adherent macrophages.

DNA of sandfly vectors was extracted using the Biopur Kit Extraction Mini Spin Plus (Biometrix, Pinhais, PR, Brazil), according to the manufacturer's recommendations. All

DNA samples were verified for purity (ratios 260/230 nm and 260/280 nm) using spec-trophotometry (NanoVue, GE Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden) and quantified using Qubit Fluorometric Quantification (Invitrogen) with a Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). The DNA was stored at -20°C until use.

1.3. Real-Time Quantitative PCR (qPCR) Assays

qPCRs were performed using a fluorescent dye that binds to the double-stranded DNA molecule (qPCRBIO SyGreen Mix Separate-ROX, PCR BioSystems, Archway Rd, LDN, UK) and $0.2\ \mu\text{M}$ of each primer (forward and reverse) in a final volume of $10\ \mu\text{L}$. The qPCRs also contained 12 ng of genomic DNA from human, parasite, macrophage cell line, phlebotomine, or animal samples.

The LinJ31_L42486.1 primer (Forward 5'-GCGACGTCCGTGGAAAGAA-3'/Reverse 5'-GGCGGGTACACATTAGCAGAA-3') used elsewhere [43–46] was used as an external control for *L. infantum* in the in vitro assays.

Primers for endogenous genes were used for host DNA quality checks. The endogenous retrovirus group 3 (ERV-3) gene (forward 5'-CATGGGAAGCAAGGGAATAATG-3'/reverse (5'-CCCAGCGAGCAATACAGAATTT-3') [47,48] and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene (forward 5'-TCAACGGATTGGCCGTATTGG-3'/reverse 5'-TGAAGGGTCATTGATGGCG-3') [49,50] were used to amplify human and animal samples, respectively. Primers for the cacophonic gene (IVS6_ (forward 5'-GTGGCCGAACA-TAATGTTAG-3'/reverse 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3') [51] were used in the sandfly vectors.

The cycling conditions were as follows: 95°C for 20 s for denaturation, followed by 40 cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 30 s, and a melting curve at 95°C for 15 s and $60\text{--}95^{\circ}\text{C}$ for 1 min ($0.5^{\circ}\text{C}/5\ \text{s}$).

1.3.1. Standard Curve

Parasite load was estimated using known amounts of genomic DNA extracted from promastigote cultures of *L. infantum* (HUUFS14 strain) and considering the DNA mass equivalent to one parasite. This calculation is detailed in the Supplementary Material Table S1.

The genome size of *L. infantum*, which is 32.13 Mb [52], was taken into account with 15.8% mass of kinetoplast (kDNA) of one parasite [53]. Standard curves were constructed using HUUFS14 strain DNA (*L. infantum*) with the LinJ31_2420 primer. Additionally, a standard curve was constructed using the Catalase_LVH60_12060_1F primer to identify *Crithidia* sp. [28] in DNA samples using the LVH60_C3 strain as a template.

The predicted genome length of the LVH60 clinical isolate was 34.4 Mb (available in the NCBI database under accession BioProject PRJNA940846). This size was used to estimate the DNA mass equivalent to that of a parasite [54]. Calculations of DNA mass equivalent to one parasite are shown in Supplementary Table S1. Serial dilutions corresponding to 10^5 up to 1 parasite/reaction were used for the standard curve construction (in Supplementary Table S2). Host genetic material (human or animal) not infected by any trypanosomatid was used as a fixed background, containing 3 ng of DNA for each standard curve point.

1.3.2. qPCR Assay Evaluation

DNA samples from *L. amazonensis* (M2269 strain), *Crithidia* sp. (LVH120 isolate, BioSample SAMN33579964), *L. braziliensis* (M2903 strain), *T. cruzi* (Y strain), and uninfected vertebrate hosts (human, canine, feline, and mouse) were used as negative controls to verify non-specific amplification.

Spike-in qPCR was performed by mixing different proportions of genomic DNA from each known species [55], to evaluate the accuracy of the LinJ31_2420 and Catalase_LVH60_12060_1F primers. The assay was performed in duplicate using a mixture of HUUFS14 strain DNA (*L. infantum*) and *Crithidia* sp. DNA (LVH60_C3 strain). Parasite proportions were calculated according to the mass equivalence of the parasite DNA.

(Supplementary Materials Table S3). A fixed background of 3 ng DNA from each host species was used. Reproducibility and repeatability assays were performed in duplicate using two different qPCR devices: (i) a 7500 Fast Dx Real Time PCR Machine (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), with data generated by 7500 Software Fast Real Time PCR Systems v2.0.6; and (ii) an AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA), with data generated by AriaMx/AriaDx software. These assays were evaluated using the percentage coefficient of variation (CV) = [(standard deviation/mean) 100], based on the mean Cq values [44,56].

×

1.4. PCR, Amplicon Sequencing, and Sequence Analysis

PCRs were performed using approximately 100 ng of promastigote DNA, 30 ng of human DNA, and 20 ng of animal DNA as a template, and a Taq DNA Polymerase kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction consisted of a final concentration of 1 Taq Buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄), 0.2 mM Deoxyribonucleotides triphosphate (dNTP) (Thermo ScientificTM, Waltham, MA, USA), 0.4 μM of each primer (forward and reverse), 2 mM MgCl₂, 0.05 unit of Taq DNA Polymerase, and nuclease-free water to a final volume of 25 μL per reaction. The cycle conditions for LinJ31seq and Crid2.1seq were maintained in a Biometra Tone (Analytikjena, Jena, Turingia, DE) thermocycler at 95 °C for initial denaturation, followed by 34 cycles at 94 °C for 45 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 40 s, and 72 °C for 5 min for final extension. The cycle conditions for LVH60a_Tig001 were maintained in the same thermocycler at 95 °C for 20 s for denaturation and amplification at 95 °C for 5 s, followed by 40 cycles at 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and then 72 °C for 5 min for final extension.

All genomic material used in the PCRs with LinJ31seq, Crid2.1seq, and LVH60a_Tig001 primers was visualized by agarose gel electrophoresis (1%), and images were documented using Chemidoc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). The patient and dog samples required enrichment of the product from the first PCR using the LinJ31seq primer. PCR enrichment consisted of using the diluted product (at a 1:10 ratio) of the first PCR using the LinJ31seq primer (see Table 1) in a second reaction with the same primer. The same procedure was performed for sandfly samples using the LinJ31_2420 primer.

Genomic DNA of bone marrow (patients and dogs) and clinical isolates was used in Nested-PCRs with the TRY927 primer (Forward 5'-GAAACAAGAAACACGGGAG-3'/ Reverse 5'-CTACTGGGCAGCTTGGA-3') and SSU561 primer (Forward 5'-TGGGATAAC-AAAGGAGCA-3'/ Reverse 5'-CTGAGACTGTAACCTCAAGC-3') in the study by Noyes et al. [57] to amplify a small subunit ribosomal RNA (18S rRNA) region, using a Biometra Tone thermocycler (Analytik Jena, Jena, Turingia, DE). Amplicons were purified using the PureLinkTM PCR Purification Kit (Invitrogen) and quantified by spectrophotometry using NanoVue apparatus (GE Healthcare, Björkgatan, Uppsala, Sweden). Amplicon sequencing was performed using the Sanger method with the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. The reactions were prepared with 3.2 pmol of the forward primer SSU561, 10–20 ng of purified PCR product of SSU561 amplicons, and ultrapure water adjusted to a final volume of 7 μL.

Phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences was performed using MEGA6 [58].

Phylogenetic trees with sequences from an LVH60 patient and from the bone marrow and peripheral blood of dogs were reconstructed using the Maximum Likelihood (ML) method based on the Tamura–Nei model with Bootstrap tests (1000 replicates). Corresponding 18S rRNA sequences from other trypanosomatid species to compose the analysis were retrieved from the NCBI database and/or TriTrypDB using BLASTN searches.

1.5. Experimental Validation

1.5.1. In Vitro Infection with THP-1 Macrophages

The detection and estimation of the parasitic load in in vitro infections were performed using qPCR assays. For infections using the HUUFS14 strain (*L. infantum*), the LinJ31_2420 primer was used and the LinJ31_L42486.1 primer [43–46] was used as an external control. In addition, in vitro infections with *Crithidia* sp. LVH60A, LVH117C1, and *C. fasciculata* (TCC039E strain) were quantified through qPCR using the Catalase_LVH60-12060 primer. In vitro infection was performed in 12-well plates for DNA extraction. Immortalized THP-1 monocytic cells (a human cell line derived from acute monocytic leukemia) [59] were differentiated into macrophages and infected with different species/strains of parasites. Monocytes were counted such that each well contained 1×10^6 cells. A 24-well plate was also used for microscopy, in which 10 mm round coverslips were placed for microscopy analysis. The monocytes were seeded at a density of 5×10^5 cells/well. The stationary phases of *Leishmania infantum* (HUUFS14 strain), *Crithidia* sp. strains (LVH60a_C1 and LVH117_C1), and *C. fasciculata* (TCC039E strain) obtained on the 7–8th day of culture were used for in vitro infection. The ratio used for the infection of THP-1 cells was 10 parasites to 1 macrophage (MOI 10:1). Initially, the plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 3 h. After this period, all wells were washed with incomplete RPMI 1640 (Gibco™, Grand Island, NY, USA) to remove extracellular parasites, and complete medium was added to the infected cells. Infected cells were incubated for 24, 48, and 72 h. The Romanowsky staining method was used with the Rapid Panoptic Kit (LarboClin, Pinhais, PR, BR) on 10 mm round coverslips, which were then mounted on slides. The microscopic evaluation of infected macrophages was performed manually using an optical microscope (Olympus, Tokyo, TYO, JPN, 100 objective), counting 100 macrophages per coverslip and determining the number of amastigotes in these cells.

1.5.2. In Vivo Infection

Male hamsters (*Mesocricetus auratus*) were separated into groups of four individuals at 3 weeks of age and infected by intracardiac inoculation with a concentration of 1.7×10^7 metacyclic promastigotes/mL of *L. infantum* in the stationary growth phase, previously selected with peanut agglutinin (PNA) (500 µg/mL). Clinical isolates were obtained from patients with VL at the Institute of Tropical Diseases Natan Portela in Teresina, Piauí, Brazil, and were identified as strains #1580, #1686, #1851, and #515. PBS 1 was used as a negative control (non-infected group) for infection in hamsters. The animals were followed up for 9 months and euthanized with ketamine (200 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), based on clinical signs of the disease. During necropsy, the spleen and liver were excised and segmented for DNA extraction.

1.5.3. Sample Collection

Tissue samples (bone marrow and peripheral blood) and clinical isolates (LVH abbreviation) were obtained from patients diagnosed with VL at the Federal University Hospital of the University of Sergipe (HUUFS) in Aracaju, Sergipe, Brazil. Clinical isolates used in the in vivo experimental infections (Section 2.5.2.) were isolated from patients with VL admitted to the Institute of Tropical Diseases, Natan Portela, Teresina, Piauí, Brazil. A positive rK39 serological test (Kalazar Detect Rapid Test, InBios International Inc., Seattle, WA, USA) along with direct observation of *Leishmania* in a bone marrow aspirate or a positive culture in Novy–MacNeal–Nicolle (NNN) medium were used to confirm the diagnosis of VL. Bone marrow and peripheral blood samples were collected from dogs and cats diagnosed with VL; diagnosis of the animals was based on the characterization of the signs of leishmaniasis and on the hematological, biochemical, and serological parameters shown by the animals housed in a shelter in the municipality of Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. Phlebotomine samples (*Lutzomyia longipalpis*) were collected as described by Ferreira et al. [60], between January and June in 2014 and 2016 in the municipality of Rio Verde de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Brazil. The pools of insects collected consisted of 10–15 females captured

in CDC light traps placed in the peridomicile. The insects were stored in 70% alcohol until use.

1.6. Data Analysis

Amplicon sequencing: The chromatograms generated by Sanger sequencing were subjected to quality control using Chromas software Version 2.1.5 (<https://technelysium.com.au/wp/>, accessed on 30 April 2022). Data analysis was performed using the Mega6 alignment and phylogeny program [58].

Parasite detection: The detection and efficiency of the LinJ31_2420 primer in *L. infantum* (HUUFS14 and PP75 strains) were compared with another set of established primers, LinJ31_L42486.1 [43–46], by analyzing the amplification plots (Cq values) and dissociation curves. *Crithidia* sp. parasites were also detected using the Catalase LV60-12060_1F primer. Primer efficiency analyses were performed using amplification plots and the dissociation curve graphs. The detection limit of the qPCR assay, which refers to the smallest amount of parasite detected, was determined by calculating the mean and standard deviation of the Threshold Cycle (Cq) values [61,62].

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Version 5. Two-way ANOVA was performed using the mean values of the estimated parasite burden for in vitro infections with THP-1 macrophages. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

1.7. Ethics Statement

The procedures for the collection of material from patients were performed according to the guidelines of the Brazilian Human Research Ethics Evaluation System (CEP/CONEP) and approved by the local Ethics Committee: (i) Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil (protocol CAAE:04587312.2.0000.0058) and (ii) Institute of Tropical Diseases Natan Portela in Teresina, Piauí, Brazil (protocol CAAE:0116.0.045.203-05). Prior to the study, patients or their legal guardians were informed and signed the consent form.

Animal samples (dogs and cats) were collected according to the guidelines of the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Animal Science and Food Engineering Faculty of the University of São Paulo (FZEA-USP) and were approved under registration number 6147100518. The genomic DNA samples from cats with VL used in this study were the same as those used by Vioti et al. [40] between 2015 and 2019 from two animal shelters in the municipality of Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. This study was approved by the CEUA of the Faculty of Food Science and Engineering, University of São Paulo (FZEA-USP), under protocol numbers 7627010517 and 8541011019.

The procedures for infections in hamsters (*Mesocricetus auratus*) were approved by the Local Ethics Committee for the use of animals at the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, CEUA-FMRP/USP (process number 234/201). The phlebotomine vectors from the study by Ferreira et al. [60] were collected from sites designated by the entomological surveillance of the municipality of Rio Verde de Mato Grosso, authorized by the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO) under registered license number 33156-2.

2. Results

2.1. Real-Time PCR Performance and Validation of the Method

First, we standardized a new gene target for the molecular detection of *L. infantum*. LinJ31_2420 (98 bp) and LinJ31_seq (444 bp) amplicons refer to the putative single-copy p-nitrophenylphosphatase gene, which is located on chromosome 31 of the JPCM5 reference genome [37,53,63]. When the first version of the genome was released, this gene was considered unique to *L. infantum*. Subsequently, it was also found in other *Leishmania* species (Supplementary Table S4). The alignment of primer sequences in the genes from the JPCM5 and HUUFS14 *L. infantum* strains showed 100% nucleotide identity (NI) for the putative p-nitrophenylphosphatase gene (NCBI Reference Sequence: XM_001467522.1). Primer sequence alignment in other *Leishmania* species showed lower and diversified

nucleotide identity (NI) compared with *L. infantum*, in addition to two gaps in the region of the forward primer. In addition, the predicted melting temperature (T_m) for possible amplicons in other *Leishmania* species, as well as the GC content, differed from that observed for *L. infantum* (Figure 1). This means that if amplification of another *Leishmania* species putatively occurs, analysis of the dissociation curves may elucidate species identity.

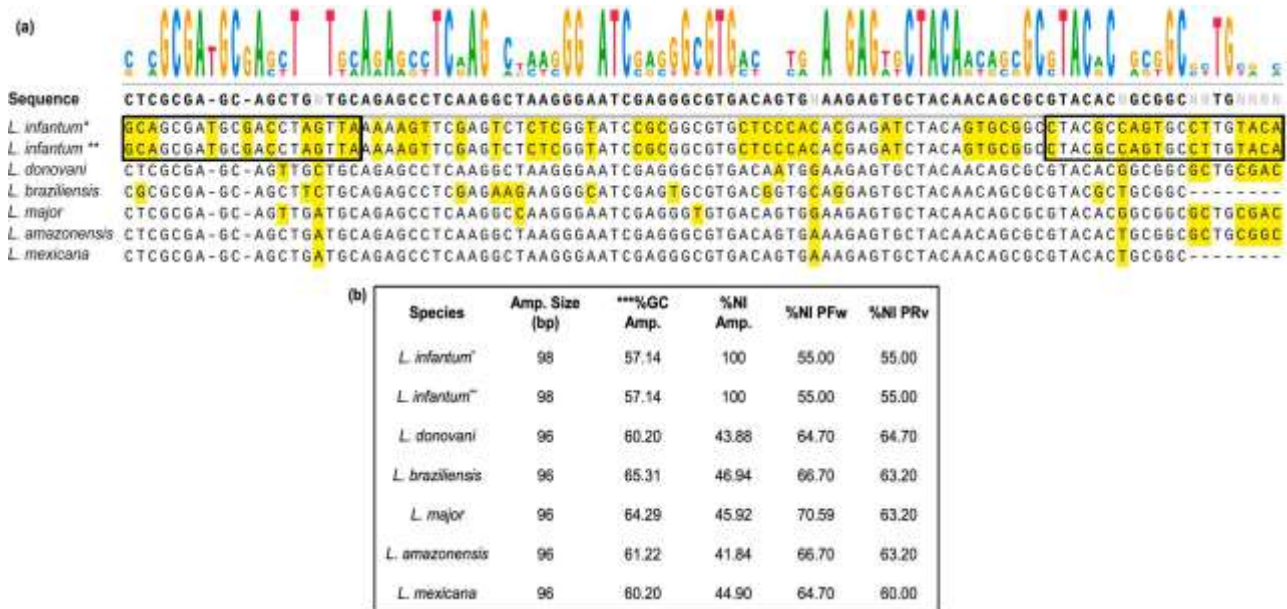


Figure 1. Sequence alignment of the region (98 bp) targeted by the primer LinJ31_2420 in *Leishmania* parasites. (a) Region of 98 bp in the putative p-nitrophenylphosphatase gene, in which the LinJ31_2420 primer aligned in the *L. infantum* JPCM5 reference strain (XM_001467522.1) and in the HUUF514 laboratory strain. Positions at the 5' and 3' ends where primer annealing occurs are highlighted in the black box. The sequence logo of the alignment is shown at the top of the figure. Positions with nucleotide polymorphisms are highlighted in yellow. (b) Box summarizes the main features of the sequence targeted by the LinJ31_2420 primer in *L. infantum* and other *Leishmania* species. The asterisks indicate: * JPCM5, the reference genome of *L. infantum* (Genome assembly ASM287v2) and ** HUUF514, the genome of laboratory strain (Genome assembly HUUF514) used for experiments. *L. donovani* (accession number: LdBPK 312410.1), *L. braziliensis* (accession number: LbrM. 31.2620), *L. panamensis* (accession number: LPAL13 310028600), and *L. major* (accession number: LmjF. 31.2340); *L. amazonensis* (accession number: LAMA 000645300) and *L. mexicana* (accession number: LmxM. 30.2340). Amp: amplicon; NI: percentage of nucleotide identity; *** percent guanine (%G) and cytosine (%C); forward primer (PFW); reverse primer (PRV); bp: base pair. The alignment was generated and formatted using SnapGene® software version 7.0.

For technical validation, qPCR assays were performed and compared with known primers described elsewhere [43–46], which were used for *L. infantum* detection (LinJ31_L42486.1). According to the analysis performance of the dissociation curve for LinJ31_2420 and LinJ31_L42486.1, single peaks were observed with T_m values of 83.35 °C and 77.56 °C, respectively (Supplementary Figure S1a,b), indicating the specificity and stability of primers. Amplification plots of six-point standard curves for both primers are shown in Supplementary Figure S1c,d. Detailed calculations for the standard curve construction are presented in Supplementary Table S2.

We then standardized the molecular detection of *Crithidia* sp. LVH60A. The catalase _LVH60-12060_1F primer was based on the predicted catalase enzyme gene identified in the genome of a clinical isolate of a *Crithidia*-related parasite (LVH60a clone 1 strain) obtained from an atypical VL case [28]. Catalase is absent in dioxenous trypanosomatids (*Leishmania* and *Trypanosoma*) and is present in the monoxenous genera of Trypanosomatidae, such as *Crithidia* and *Leptomonas* [31,32,64] (Supplementary Table S5). This primer showed

specificity for the *Crithidia* sp. LVH60A cultured isolate without amplification of *L. infantum* (HUUFS14 strain), *T. cruzi* (Y strain), or host DNA (human) (Supplementary Figure S2).

Six-point standard curves using the Catalase_LVH60-12060_1F primer with DNA samples from the *Crithidia* sp. LVH60-C1 strain and *C. fasciculata* TCC039E were generated (Supplementary Figure S3). Both *Crithidia* parasites showed similarities in terms of amplification melting temperature, with a mean T_m of 84.79 °C (LVH60A) and 85.00 °C (TCC039E). The dissociation curve for TCC039E (*C. fasciculata*) exhibited a secondary peak at ~81 °C. To rule out the possibility of non-specific amplicons, we performed agarose gel electrophoresis analysis, which showed single qPCR products for all reactions (Supplementary Figure S3d). This dissociation curve profile can be explained by multi-stage melting transitions raised by sequence-specific characteristics, such as polymorphisms and GC rich regions.

The sequence of the amplicon Catalase_LVH60-12060_1F (107 bp) was searched against the genome of *Crithidia* sp. LVH60A and *C. fasciculata* (CfCl strain). BLASTN match hits revealed four copies of the catalase gene in both species located on different chromosomes (Figure 2). In both genomes, three copies were of the same size and one copy was of a smaller size (103 bp). The four copies presented few changes in sequence compared with the reference amplicon (depicted in yellow); however, *C. fasciculata* catalase copies presented three more polymorphisms than *Crithidia* sp. LVH60A. These variations in sequences due to several gene copies may explain the potential occurrence of secondary peaks in qPCR melting curves.

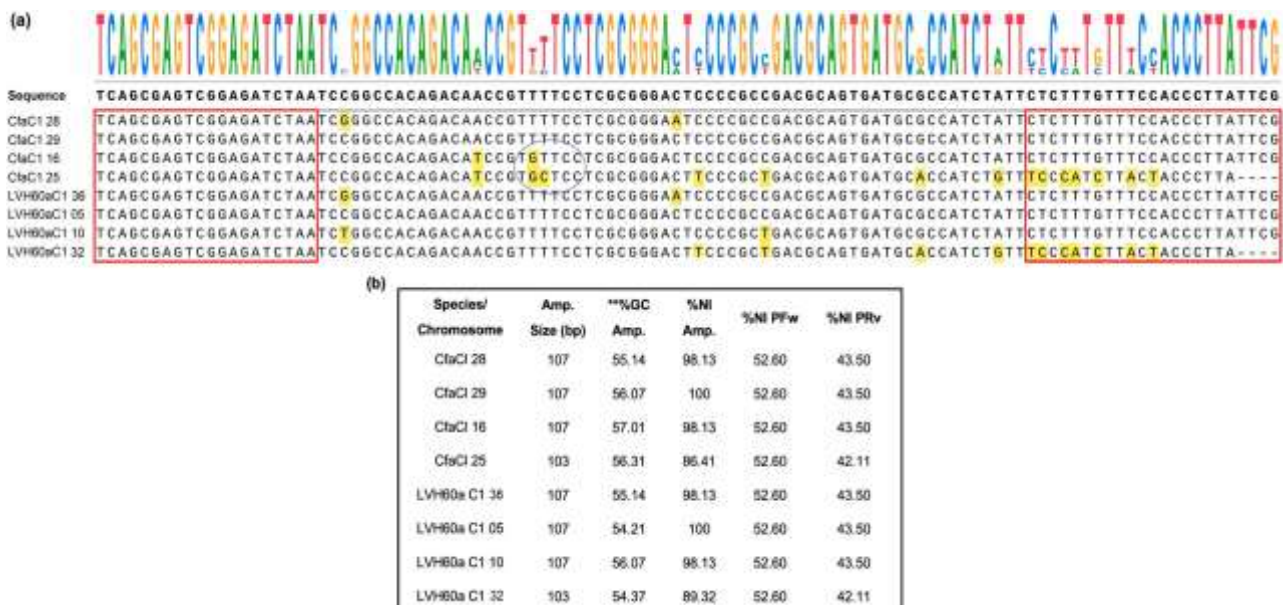


Figure 2. Sequence alignment of the region (107 bp) targeted by the primer Catalase_LVH60-12060_1F in *Crithidia* parasites. (a) Region of 107 bp in the putative catalase gene, where Catalase_LVH60-12060_1F primer alignment sequences occur in LVH60a_C1 (*Crithidia* sp., LVH60A) and *C. fasciculata*. The positions at the 5' and 3' ends, where primer annealing occurs, are highlighted in the red frame. The sequence logo of the alignment is shown at the top of the figure. The blue circle indicates the regions of polymorphisms found in CfaCl 16 and CfaCl 25 from *C. fasciculata*. (b) The box summarizes the main features of the sequence targeted by the Catalase_LVH60-12060_1F primer in the *Crithidia* parasites. Four copies of the gene in these species were observed in the chromosome of *C. fasciculata* (CfaCl 28 CFAC1_280006600, CfaCl 29 CFAC1_290005500, CfaCl 16 CFAC1_160031400, and CfaCl 25 CFAC1_250006200) and sequences regions of genome of the LVH60a_C1 (Chromosome 36, Chromosome 05, Chromosome 10, and Chromosome 32. Amplicon (amp.); percent nucleotide identity (%NI); ** percent guanine (%G) and cytosine (%C); forward primer (PFw); reverse primer (PRv); base pair (bp). Alignment was generated and formatted using SnapGene® software version 7.0 (Insightful Science).

qPCR standard curves for parasite detection and quantification were set up with known quantities of DNA from promastigote culture in 10-fold serial dilutions and a fixed host DNA quantity as background. Parasite quantity for the standard curve was estimated by calculating the equivalent genomic DNA mass for one parasite (~81 fg) setup at six points ranging from 1×10^5 parasites to 10^0 parasites (Table S2, Supplementary Material). Amplification plots and standard curves for reactions using LinJ31_2420 or Catalase_LVH60-12060_1F primers showed reliable performance (Figure S4 and Figure S5, respectively; Supplementary Material).

To evaluate the specificity, repeatability, and reproducibility of the qPCRs using both primers, host DNA was used as the background (simulating an infected host sample), and assays were performed on qPCR instruments from two different brands to assess the technical variation. Regarding primer specificity for detecting parasite material, genomic DNA from four different types of mammalian hosts was used as the background in qPCR standard curve reactions: human, dog, cat, and mouse. All of these types of hosts are commonly used in leishmaniasis research. Regardless of the source of host DNA as background, all qPCR standard curve reactions resulted in high performance in assays running on qPCR instruments of two different brands, as observed in parameters such as the coefficient of determination (R^2) and efficiency (Eff) displayed in Table S6 (Supplementary Material), showing that there was no cross-amplification of host DNA. Coefficient R^2 values for LinJ31_2420 and Catalase_LVH60-12060_1F primers ranged from 0.95 to 0.99, with very low variation among different types of host DNA background. Reactions performed on one particular instrument showed the highest values of R^2 for both primers (~0.99).

The repeatability and reproducibility of qPCRs were assessed through CV measurements in intra-assays (reactions in the same plate) and inter-assays (reactions from different plates were run on different instruments). Overall, the assays presented reliable performance, i.e., they exhibited very low coefficients of variation (Figure 3). Intra-assays using the LinJ31_2420 primer presented a homogenous average CV as low as 1.5%, as observed in Figure 3a (except for reactions using cat DNA as the background, CV ~5%). For the catalase primer, the variation in intra-assays was slightly higher but still exhibited small values, as shown in Figure 3b. Reactions using human DNA and dog DNA showed the highest variation (CV ~2.5% and CV ~3.5%, respectively).

Comparisons between assays set up using different qPCR instruments also presented a low inter-assay CV with both primers across different amounts of parasite DNA (Figure 3c,d). For the Lin31_2420 primer, the detection of *L. infantum* DNA presented an average CV of ~10% between assays performed with two instruments, using human, dog, and mouse DNA as the host background; cat DNA presented the lowest CV. Variations in the catalase primer used to detect *Crithidia* sp. were lower than 10% regardless of the host background; however, a small fluctuation in the CV values across the points of the standard curve was observed, mainly in the extreme number of parasites in the reactions (1 and 10^5 parasites).

Recently, coinfection with *L. infantum* and *Crithidia* sp. was reported in a multi-relapsed case of visceral leishmaniasis [24]. To simulate a co-infection scenario, we performed spike-in assays, in which known amounts of *Crithidia* sp. LVH60A and *L. infantum* DNA were mixed experimentally, and different host DNA was used as the fixed background in the reactions (Figure 4). For reference, assays with pure parasite DNA (either from *L. infantum* or *Crithidia* sp.) were set up with 5×10^2 or 5×10^4 equivalent numbers of parasites. The observed Cq values for the LinJ31_2420 primer, using *L. infantum* DNA as a template, were within the expected value for a 10-fold serial dilution (qPCR slope ~3.29, Table S6), with a difference lower than half Cq. As observed in Figure 4a, the Δ Cq between reactions containing 5×10^4 (Cq ~17) and 5×10^2 (Cq ~24) equivalent numbers of parasites were ~6.8 cycles, as expected. Similarly, this small difference was observed in assays using the catalase primer with *Crithidia* sp. LVH60A DNA as a template, using only human as the host background, as displayed in Figure 4b. The Δ Cq values between reactions containing 5×10^4 and 5×10^2 equivalent numbers of parasites for dog and mice as the

host background were ~ 3.2 cycles rather than ~ 6.4 cycles, as would be expected according to the qPCR slope for the catalase primer. Furthermore, we spiked *L. infantum* DNA into the reactions to detect *Crithidia* sp. LVH60A, and vice versa (we spiked *Crithidia* sp., LVH60A DNA into reactions to detect *L. infantum*) with different proportions of spiked parasite DNA amounts, 1:1 (5×10^2 *L. infantum* to 5×10^2 *Crithidia* sp. LVH60A), and 1:100 (5×10^2 *L. infantum* to 5×10^4 *Crithidia* sp. LVH60A or vice versa). In this artificial co-infection simulation, both primers were very specific, presenting very low inhibition in the presence of DNA from another parasite species, regardless of the proportion tested, as shown in Figure 4c,d for LinJ31_2420 (Cq ~ 23.4) and catalase (Cq ~ 21.9) primers, respectively.

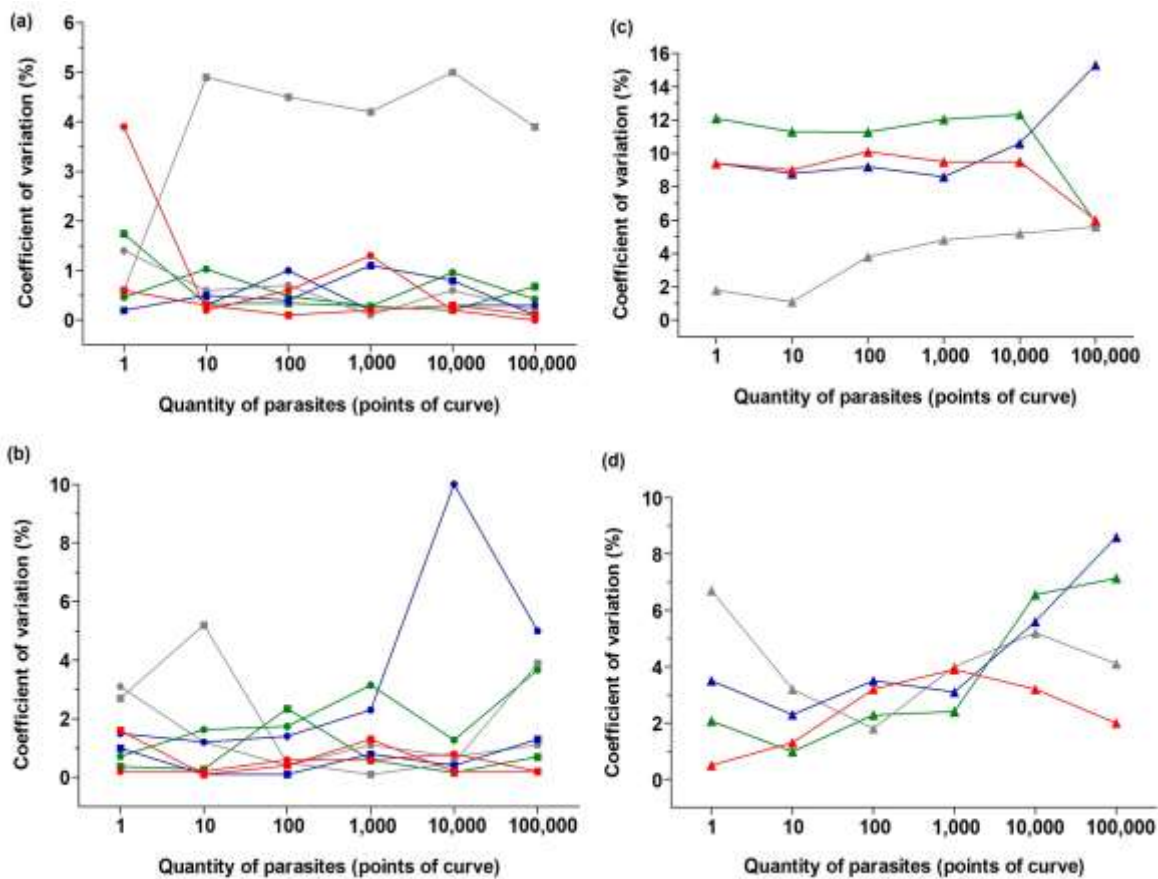


Figure 3. Coefficient of variation (%) of qPCR standard curves in intra- and across inter-assays:

(a) Repeatability (intra-variation in graphs on the left) and reproducibility (inter-variation in graphs on the right) of assays with the LinJ31_2420 primer (a,c) and assays with Catalase_LVH60-12060_1F primer (b,d), measured using the coefficient of variation (CV%) expressed as a percentage. CV% of intra-assays was calculated with replicates within the same plate (run with instrument 1, square symbols, or run with instrument 2, circle symbols), whereas the CV% of inter assays was calculated with replicates across plates performed with different qPCR instruments (i.e., comparison between plates/instruments, triangle symbols). DNA from the M2903 strain (*L. braziliensis*), M2269 strain (*L. amazonensis*), Y strain (*T. cruzi*), and vertebrate hosts did not show amplification for the primers LinJ31_2420 and Catalase_LVH60-12060_1F. Amplification was not observed in the no-template reaction. Control endogenous genes of endogenous retrovirus group 3 (ERV-3) for humans and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) for other vertebrate hosts were used. DNA from vertebrate hosts was used as a fixed background (6 ng) at all points in the qPCR curve (green indicates human DNA, gray indicates cat DNA, blue indicates dog DNA, and red indicates mouse DNA). Graphs were generated using GraphPad Prism Version 5.00 software.

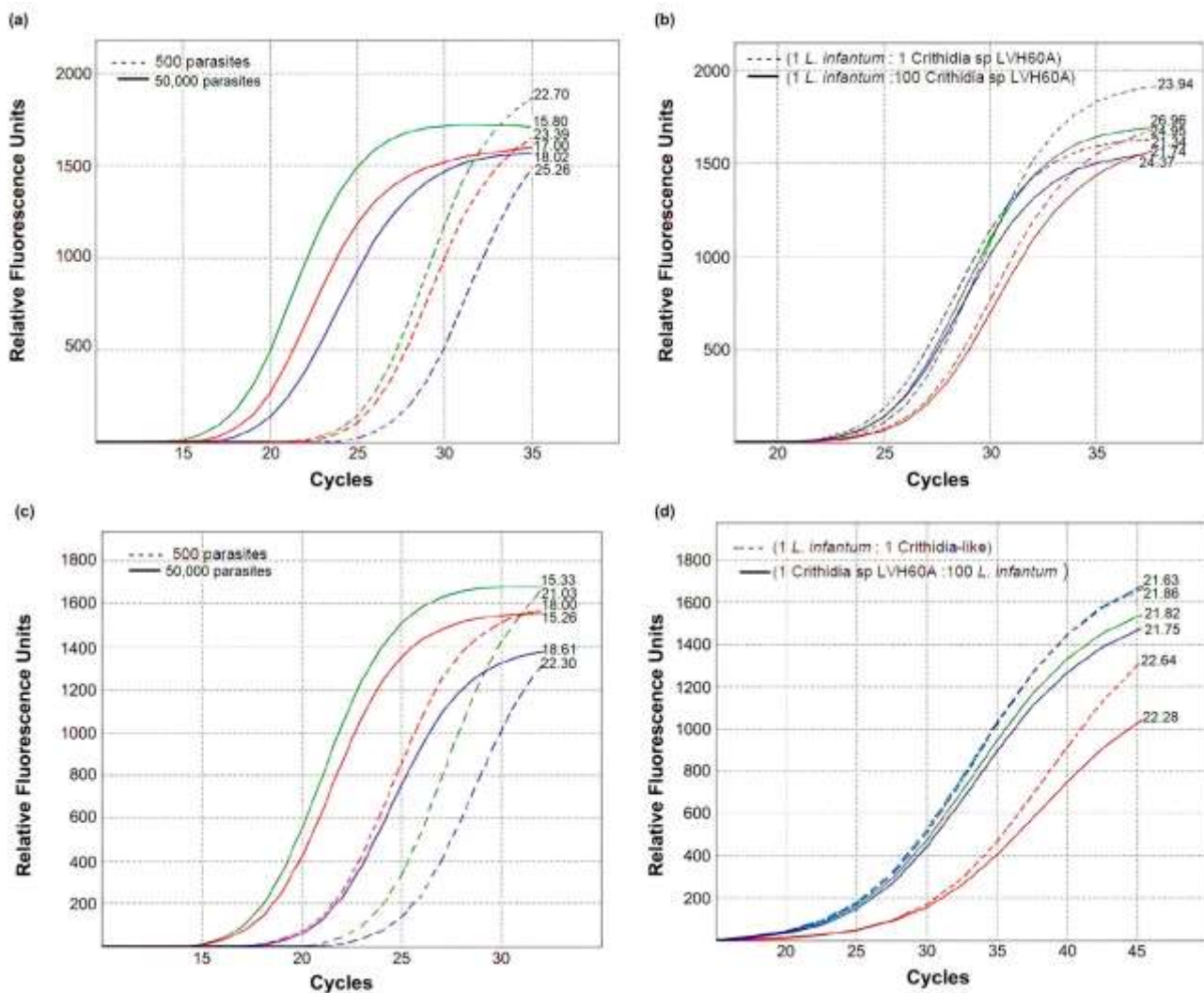


Figure 4. Accuracy of qPCR assays on parasite quantification assessed through a spike-in experiment for each primer. **(a)** Accuracy of qPCR assays for parasite quantification assessed through a spike-in experiment for each primer. **(a)** Quantification of *L. infantum* DNA with the LinJ31_2420 primer using known amounts of equivalent number of parasites (500 parasites, curves in dashed lines; 50,000 parasites, curves in solid lines). The numbers on the curves indicate the threshold Cq values for quantification of *L. infantum*. **(b)** Quantification of *L. infantum* DNA with the LinJ31_2420 primer in a spike-in experiment using DNA from *Crithidia* sp. LVH60A (LVH60_C3 strain) in two proportions: 500 *L. infantum* parasites:500 *Crithidia* sp. LVH60A parasites (1:1), curves in dashed lines; and 500 *L. infantum* parasites:50,000 *Crithidia* sp. LVH60A parasites (1:100), curves in solid lines. The numbers in the curves indicate the threshold Cq values for quantification of *L. infantum*. **(c)** Quantification of *Crithidia* sp. LVH60A DNA with the Catalase_LVH60-12060_1F primer using known amounts of an equivalent number of parasites (500 parasites, curves in dashed lines; 50,000 parasites, curves in solid lines). The numbers on the curves indicate the threshold Cq values for quantification of *Crithidia* sp. LVH60A. **(d)** Quantification of *Crithidia* sp. LVH60A DNA with the Catalase_LVH60-12060_1F primer in a spike-in experiment, using DNA from *L. infantum* in two proportions: 500 *Crithidia* sp. LVH60A parasites:500 *L. infantum* parasites (1:1), curves in dashed lines; and, 500 *Crithidia* sp. LVH60A parasites:50,000 *L. infantum* parasites (1:100), curves in solid lines. The numbers on the curves indicate the threshold Cq values for the quantification of *Crithidia* sp. LVH60A. DNA (6 ng) from each vertebrate host was used as a background to simulate an infection (graphs **(a,c)**) or co-infection scenario (graphs **(b,d)**), in which green, blue, and red curves represent host DNA from humans, dogs, and mice, respectively.

2.2. Validation of the Novel qPCR Assay and Gene Targets in Experimental Conditions

To assess the performance of these novel qPCR assays in quantifying parasites experimentally, we performed the in vitro infection of human macrophages derived from THP-1 cells with *L. infantum* or *Crithidia* sp. LVH60A parasites (LVH60a_C1 and LVH117_C1, both are clones) [24,28]. The parasite load was estimated at different post-infection time periods, such as 24, 48, and 72 h for *L. infantum* infection (Supplementary Figure S7a); parasite quantification was also performed with the LinJ31_L42486.1 primer as a reference control (Figure 5a). The standard curve with the LinJ31_2420 primer presented average slope values of 3.26 ± 0.06 with R^2 of 0.94 ± 0.03 , and an efficiency of 103.8%, while the standard curve with the LinJ31_L42486.1 primer presented an average slope of 3.03 ± 0.06 , R^2 : 0.97 ± 0.03 and 117.09% of efficiency. Control reactions for human DNA detection were performed using the ERV-3 primer, which is only able to detect the macrophage DNA (12 ng of DNA from the in vitro infection experiment, presented an average Cq of 26 ± 0.05). As shown in Figure 5a, both primers for *L. infantum* were able to quantify parasite load at different time points, showing a high positive correlation between the two measures (Supplemental Figure S6, $R^2 = 0.99$). The parasite loads for *L. infantum* at 24 h, 48 h, and 72 h were ~ 2766 , ~ 493 , and ~ 241 equivalent parasites, respectively.

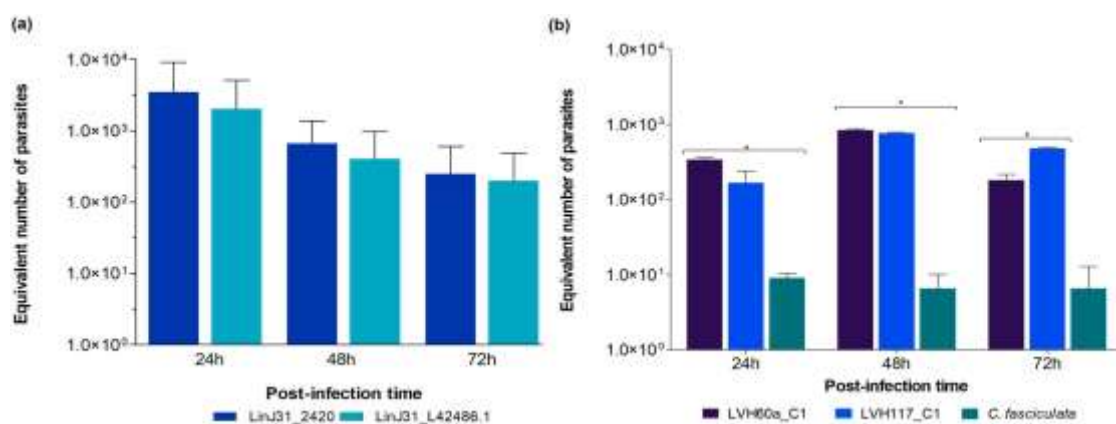


Figure 5. Quantification of *L. infantum* or *Crithidia* parasites in in vitro infections of THP-1-derived macrophages. **(a)** DNA extracted from THP-1 cultures infected with HUUF514 *L. infantum* strain at 24, 48, and 72 h was used to quantify the equivalent number of parasites through qPCR using LinJ31_2420 primer. Primer LinJ31_L42486.1 [43–46] was used for comparison. No statistically significant difference was found between the two groups. **(b)** DNA extracted from THP-1 cultures infected with LVH60a_C1 and LVH117_C1 *Crithidia* sp. LVH60A strains at 24, 48 and 72 h, as well as the TCC039E *C. fasciculata* strain, were used to quantify the equivalent number of parasites by qPCR using the Catalase_LVH60_12060_1F primer. Two-way ANOVA was performed using GraphPad Prism 5.00; $p < 0.05$ was considered statistically significant; * $p < 0.001$.

Although *Crithidia* species are supposedly monoxenous parasites exclusive to insects and are considered unable to infect mammalian cells, we showed, for the first time, that *Crithidia* sp. LVH60A parasites (cultured isolates LVH60a_C1 and LVH117_C1) [24,28] can infect human macrophages (Supplementary Figure S7b,f). The standard curve with the catalase primer presented an average slope of 3.41 with an R^2 of 0.97 ± 0.002 and an efficiency of 96.2%. The parasite load of *Crithidia* sp. LVH60A was also calculated at different post-infection times, and assays showed an average of 463 equivalent parasites in 12 ng of macrophage DNA (Figure 5b), which roughly corresponded to 18,000 human cells. As a reference control for negative infectiveness, we used the *C. fasciculata* TCC039E strain for the set of in vitro infections (Supplementary Figure S7c). As shown in Figure 5b, very low numbers of *C. fasciculata* parasites were detected, regardless of the time of infection (~ 10 parasites per 18,000 cells). We observed a significant difference between the LVH60a_C1 and TCC039E strains and a non-significant difference (ns) between LVH60a_C1 and LVH117_C1 at 24 h post-infection. A significant difference was observed between the

LVH60a_C1 and TCC039E strain and between LVH117_C1 and TCC039E at 48 h post-infection, as well as a significant difference between the LVH60a_C1 and LVH117_C1 strains, and the LVH117_C1 and TCC039E strains at 72 h post-infection. The parasite load of *L. infantum* was much higher than that of *Crithidia* sp., LVH60A; however, it is noteworthy that both LVH60a and LVH117 strains were able to infect human cells in vitro (Supplementary Figure S7f).

We also tested the novel qPCR assay to estimate parasite load in samples of in vivo infection with *L. infantum* clinical isolates from an endemic region (Teresina, Piauí, Brazil). Experimental infections were performed in hamsters using the cultured isolates #515, #1580, #1686, and #1851. DNA was extracted from liver and spleen tissues. A standard curve with the LinJ31_2420 primer was constructed using the HUUS14 strain (*L. infantum*) with an average slope of 3.106, linearity coefficient R^2 of 0.966, and an efficiency of 109.88%. Control reactions for hamster DNA detection were performed using the G3PDH primer (20 ng of DNA from the spleen and liver presented average Cq values of 20.32 ± 0.12 and 20.22 ± 0.05, respectively). In vivo infection with *L. infantum* clinical isolates showed

~727 equivalent parasites infecting the liver (Figure 6a) and ~1725 equivalent parasites infecting the spleen (Figure 6b) for the cultured isolates #1686, #1851, and #1580 (in 20 ng of DNA). We highlight cultured isolate #515, which presented more 1000-fold more parasites in the liver of hamsters, showing the high proliferative capacity of this strain in this tissue.

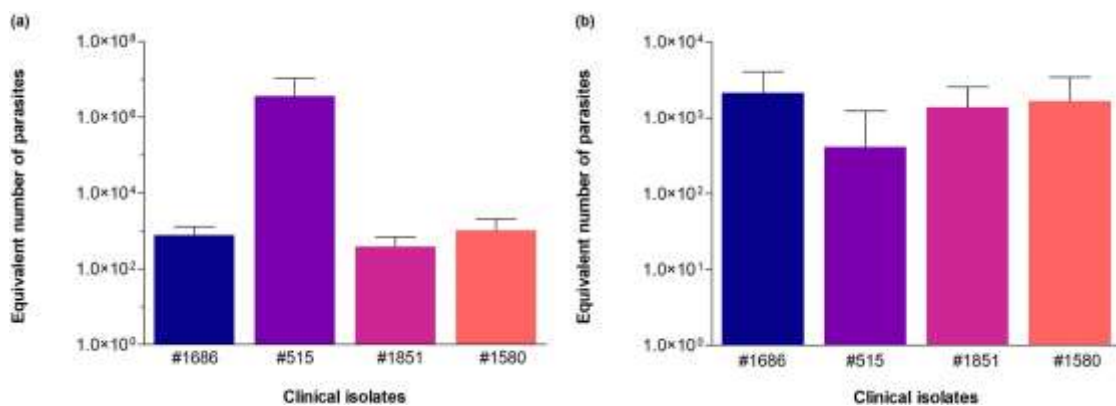


Figure 6. Quantification of *L. infantum* in organs of hamsters (*Mesocricetus auratus*) subjected to experimental in vivo infections with clinical isolates of *Leishmania*. The clinical isolates were coded as #1851, #1686, #1580, and #515. (a) Parasitic load in the liver and (b) parasitic load in the spleen, assessed by qPCR using the LinJ31_2420 primer. Equivalent number of parasites/reaction (i.e., in 20 ng of host DNA). The parasitic load among the isolates observed in each organ did not show statistically significant differences in the number of parasites. Kruskal–Wallis test was performed using GraphPad prism 5.00 software.

2.3. Validation of the Novel qPCR Assay and Gene Targets through Parasite Detection in Clinical Isolate Cultures and Host Tissue Samples

Before qPCR primers for the novel gene targets were tested in clinical and animal samples, we standardized primers for conventional PCR to screen samples for qPCR analysis. Primers were designed to be exclusive to *L. infantum* (LinJ31seq), *Crithidia* sp. LVH60A, and/or *C. fasciculata* (Crid2.1seq). In the absence of the necessary resources to develop a qPCR experiment, these primers can be used to identify these species using conventional PCR.

Crid2.1seq amplicon (502 bp) refers to a hypothetical protein gene found specifically in *Crithidia* sp. LVH60A and *C. fasciculata*. Very small variations in GC content, amplicon size, and NI were observed between *Crithidia* sp. LVH60A and *C. fasciculata* (Table 2). The Crid2.1seq primer was suitable for PCR using purified parasite DNA from *Crithidia* sp. LVH60A clinical isolate cultures. No amplification was observed for *L. infantum* DNA.

(HUUFS14 and PP75 strains), neither *L. braziliensis* (M2903, LTCP15171, and LTCP393 strains), *T. cruzi* (Y strain) or human DNA from THP-1 cell line (Supplementary Figure S8a).

Table 2. Characterization of Crid2.1seq primers in *Crithidia* sp. LVH60A, *C. fasciculata*, and *Leptomonas* spp. sequences.

Primer	Species	Chr.	Gene ID or Accession Number *	Percent Amp. Identity	** GC%	Amp. Size	Nucleotide
Crid2.1seq	<i>Crithidia fasciculata</i> (CfCl)	16	CFAC1_160022800	67.47%	A = 87.0	501 bp	T = 76.0 C = 162.0 G = 176.0
	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A (LVH60a)	10	CP119667.1	67.13%		502 bp	A = 86.0 T = 79.0 C = 166.0 G = 171.0
	<i>Leptomonas pyrrocoris</i> (H10)	15	LpyrH10_15 ^a			No match	
		16	LpyrH10_16 ^b				
	<i>Leptomonas seymouri</i> (ATCC_30220)	48	Lsey_0048 ^a			No match	
01		Lsey_01 ^b					

* TriTryDB; ** guanidine (G) and cytosine (C); ^a Forward sequence. ^b Reverse sequence. Adenine (A), thymine (T) guanidine (G) and cytosine (C). Chr: chromosome; Amp: amplicon.

The LVH60a_Tig001 amplicon (128 bp) refers to a hypothetical protein gene found specifically in *Crithidia* sp. LVH60A. This primer was suitable for PCR using parasite DNA purified from cultures of *Crithidia* sp. and LVH60A clinical isolates that showed no amplification of *C. fasciculata* (TCC039E strain), as shown in Figure S8b (Supplementary Material). The primers LinJ31seq and Crid2.1seq, designed for *L. infantum* and *Crithidia* sp., respectively, were used to screen samples of VL patients and clinical isolates by PCR (Table 3). In addition, the SSU rRNA (18S) region was amplified by Nested PCR [57] followed by amplicon sequencing using the Sanger method (Supplementary Tables S7 and S8). The accession numbers of the small subunit rRNA (ssrRNA) sequences used in this analysis are listed in Table S9.

Table 3. Samples from VL patients and clinical isolates screened through PCR with novel primers for the SSU rRNA (18S) marker.

Number of Samples	Tissue		PCR + LinJ31seq	PCR + Crid2.1seq	Nested-PCR TRY927/SSU561 [57]
Patient samples	BMVL ^a	18	13	0 ^c	18
	PB	14	6	0	7
Clinical isolates	CI ^b	53	14	48	46
	Skin (nodule/papule)	4	2	2	4 ^c
Spleen		1	0	1	1 ^d

^a BMVL: bone marrow aspirate visceral leishmaniasis; ^b CI: clinical isolates, i.e., parasite cultures obtained from bone marrow aspirate of visceral leishmaniasis patients; ^c PCR products with size smaller than expected were considered negative. PB: peripheral blood; GenBank accession number OQ581236.1 and OQ581229.1; ^d GenBank accession number OQ581233.1; ^{c/d} from Rogerio et al. [24].

Due to the very low amount of parasite DNA in patient samples (bone marrow and peripheral blood), LinJ31seq amplicon visualization on agarose gel electrophoresis was possible after performing a second batch of PCR with LinJ31seq primer using the 10-fold diluted PCR product for enrichment of the target sequence (Supplementary Figure S9). Third-

teen of the seventeen bone marrow samples were PCR-positive for LinJ31seq (*L. infantum*). Then, parasite detection and estimation of the parasite load in positive samples were performed through qPCR using LinJ31_2420 (*L. infantum*) and Catalase_LVH60-12060_1F (*Crithidia* sp. LVH60A).

In determining the parasitic load with the LinJ31_2420 primer, the construction of the standard curve consisted of six points corresponding to 1×10^1 to 1×10^6 equivalent number of parasites in 40.7 ng of parasite DNA (average Cq 18.05 \pm 1.17) at 1×10^1 equivalent number of parasites in 0.0407 pg of parasite DNA (average Cq 32.36 \pm 0.27) showed a slope of 3.071, R^2 of 0.949, and 111.6% of efficiency. The detection limit in bone marrow samples that matched the 10 equivalent parasites in 6 ng DNA was identified to be in a Cq-range of 30.0 \pm 0.8. For some samples, it was possible to detect one (1) parasite (1×10^0) in 6 ng DNA with an average Cq of 34.3 \pm 0.8. Interestingly, bone marrow aspirates of BMVL1 and BMVL12 tested positive for the two primers (Figure 7a), suggesting that the patients were co-infected with *L. infantum* (CqBMVL1 25.25; CqBMVL12 31.96) and *Crithidia* sp. LVH60A (CqBMVL1 16.55; CqBMVL12 12.04). Notably, BMVL1 and BMVL12 presented a much higher parasite quantification of *Crithidia* sp. LVH60A than *L. infantum*.

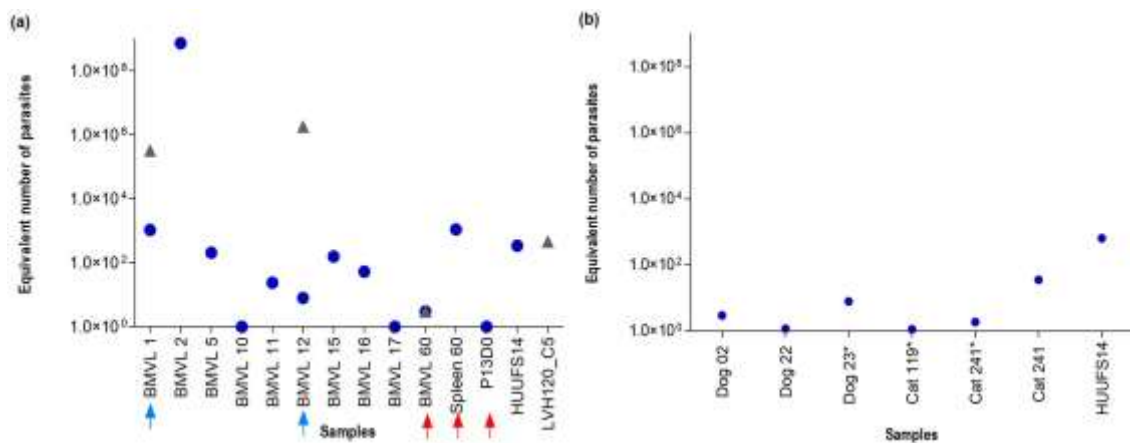


Figure 7. Quantification of *L. infantum* and *Crithidia* parasites in samples of VL patients and domestic animals by qPCR. (a) Equivalent number of parasites quantified in clinical samples of bone marrow aspirates (BMVL), spleen, and peripheral blood (P13D0) from patients with VL. Detection of *L. infantum* and/or *Crithidia* was performed using LinJ31_2420 (blue circles) and Catalase_LVH60-12060_1F (gray triangles) primers. Blue arrows indicate co-infection of *L. infantum* with *Crithidia* sp. LVH60A parasites. Red arrows refer to patient samples from a fatal case reported by Maruyama et al. (2019) [28].

(b) Equivalent numbers of parasites were quantified in bone marrow aspirates and peripheral blood

(*) from dogs and cats with clinical signs of VL and a positive serological test for *Leishmania*. Only

L. infantum was detected in domestic animal samples. DNA from *L. infantum* (HUUFS14 strain) and *Crithidia* sp. LVH60A (LVH120_C5 strain) was used as the positive control for qPCR.

Additionally, we tested samples from atypical and fatal VL cases reported by Maruyama et al. [28] using Catalase_LVH60-12060_1F and LinJ31_2420 primers. *L. infantum* was detected in spleen and blood (Figure 7a). A bone marrow aspirate sample (BMVL60) tested positive for *Crithidia* sp., LVH60A, and *L. infantum*. To support the results of the LVH60 case, the SSU rRNA (18S) marker was sequenced from these samples. Amplicon sequence analysis revealed that samples from the liver and spleen matched with *L. infantum*, whereas samples from skin biopsy, bone marrow, and blood matched with *Crithidia* sp. LVH60A (Supplementary Figure S10). Overall, these results confirmed the hypothesis raised by others [63] that the patient was co-infected with *L. infantum* and *Crithidia*.

Both the LinJ31seq and Crid2.1seq primers were tested in samples from dogs diagnosed with canine visceral leishmaniasis (VL, bone marrow, and peripheral blood), as well as in samples from cats displaying symptoms related to feline VL. No amplification was observed using the Crid2.1seq primer, and only LinJ31seq PCR products were visualized

in dog samples. The results for *L. infantum* were supported by Sanger sequencing of the SSU rRNA (18S) marker [58] (Supplementary Material, Figure S11). The accession numbers of small subunit rRNA (ssrRNA) sequences used in phylogenetic analysis are shown in Table S9. The qPCR assays for parasite detection corroborated the PCR results, showing that only *L. infantum* was detected in the tested samples (Figure 7b).

The LinJ31_2420 amplicon for vector samples proved to be viable for detection and was used in qualitative qPCR assays. There was no amplification for conventional PCR using the LinJ31seq primer and no amplifications for the Catalase-LVH60_12060_1F primer. DNA samples from seven sandfly pools were used; all females of the species *Lutzomyia longipalpis* were positive for *L. infantum*, as confirmed by Sanger sequencing of the internal transcribed spacer region, according to the results of the study by Ferreira et al. [60]. Detection was possible through the enrichment by PCR with LinJ31seq. Detection was made possible through pre-enrichment using conventional PCR with LinJ31seq. The DNA used in this first study was ~12 ng, and the PCR product was used for the qPCR with LinJ31_2420 for the detection of protozoan material, showing Cq values for the vector sample #10 of 20.54 ± 0.49, vector #63 of 19.65 ± 0.33, vector #67 of 17.87 ± 0.007, vector #75 of 28.51 ± 0.44, vector #119 ± 0.07, and vector #126 of 27.49 ± 0.07, and vector #17 of 24.91 ± 0.05, as shown by the amplification graph in Figure S12 in the Supplementary Material. The quality and integrity of the insect DNA were verified with the cacophonic gene region (IVS6) [51] present in sandflies, and in *Lutzomyia longipalpis*, the average Cq and standard deviation were 24.8 ± 5.1 and Tm 82.40 °C.

3. Discussion

Diagnostic strategies for VL developed in recent decades include parasitological and serological tools and procedures to detect protozoans in vertebrate host samples [10,16]. However, these technologies lack sensitivity and specificity, which is crucial for disease therapy and prognosis. With the advent of molecular biology tools, there has been a focus on the more robust and accurate detection, identification, and quantification of protozoan genetic material in host samples [64].

There are some reports and clinical case studies of patients with leishmaniasis in which clinical isolates have been identified and are closely related to species of trypanosomatids of the genus *Leptomas* [33–35] and *Crithidia* [20,24,28,36,65]. A review of the study and research of monoxenic trypanosomatids in clinical findings of vertebrate hosts carried out by Boucinha et al. [19] revealed that the cases seen so far were questionable by only focusing on known pathogenic trypanosomatids, since the routine diagnoses (parasitological and serological) used for the determination of the disease cannot describe the causative species. The phylogenomic applications and evolutionary studies of these kinetoplastids are being developed to understand the distribution of the biology, diversity, and establishment of the life cycle of these protozoa belonging to the polyphyletic group classified as Crithidiatae [66]. Kraeva et al. [67] addressed the need to evaluate additional samples from VL patients using specific targets capable of detecting monoxenic trypanosomatids in clinical samples. As discussed in the review by Boucinha et al. [19], an appropriate tool to ascertain whether a monoxenic trypanosomatid infection occur in leishmaniasis should ideally use PCR techniques.

In this study, we designed and standardized PCR and qPCR assays using species-specific target sequences for *L. infantum* (LinJ31_2420 and LinJ31seq), as well as for the detection of *Crithidia* (Catalase-LVH60-120_1F and Crid2.1seq) in experimental and clinical samples, as an alternative for the molecular screening and investigation of VL cases, such as those studied by Maruyama et al. [28]. Pereira et al. [68] showed the importance of using qPCR in the screening of blood donors living in areas endemic to VL in Brazil, identifying the presence of protozoan DNA in these donors. We demonstrated that through genome-based calculations of these parasites, it is possible to estimate the parasitic load and detect traces of infections in clinical samples (Figure 7).

In standard curves performed in serial dilutions based on the calculation of the massDNA equivalent to a parasite, we used a fixed amount of DNA from non-infected hosts as the background in the reactions, which showed no interference in the performance of the assays. In a study by Jara et al. (2013) [56], the detection and quantification of parasitic load by qPCR in samples of skin lesions and mucocutaneous lesions were also evaluated using higher amounts of human DNA. Sundarshan et al. [11] confirmed that quantification given by the standard curve is a relative measurement compared with clinical samples, i.e., the number of protozoa measured in a sample/tissue does not exactly match the actual parasitic load of the individual, as factors such as the stage of infection in which the host is found and losses in the DNA extraction process can generate a non-robust quantification. The primer LinJ31_2420 proved to be species-specific for VL samples and can be useful for estimating parasite load, both quantitatively and qualitatively in a range, such as high, intermediate, or low loads. The primer did not present amplification using material from other *Leishmania* species, *Crithidia* sp. LVH60A, *C. fasciculata*, and hosts (dogs, cats, rodents, and phlebotomines).

The Catalase LVH60-12060_1F primer, which targets the catalase gene, was specific for *Crithidia* sp. LVH60A and *C. fasciculata* and did not produce cross amplification for *Leishmania* sp. and host DNA. Analysis of the amplicon in genomic sequences of *Crithidia* sp., LVH60A, and *C. fasciculata* CfCl reference strain (Figure 2) revealed four gene copies with slight differences in nucleotide composition. According to Weirather et al. [69], dye-based tests can discriminate species through a dissociation curve, which is influenced by the GC content of the amplicon. However, these tests need to be carefully evaluated to avoid misidentification of species, as variations in melting temperature due to differences in buffer components, concentration of template DNA, and experiments on different devices can cause confusion [69–71].

When simulating a co-infection scenario between *L. infantum* and *Crithidia* sp. in spike-in assays with known amounts of pure DNA from each parasite species and then mixed together with host DNA, we observed that the Cq values were within the expected range (Figure 4), indicating the accuracy of the assay. The decrease in amplification efficiency observed in the results of the spike-in assay with DNA from dogs and mice may be related to the host DNA. This interference may be more pronounced if the amount of host DNA in the reaction is relatively high, which may be due to human failure in the dilutions. Overall, both primers when performing spike-in DNA showed reliable specificity with low inhibition in the presence of DNA from other parasite species, regardless of the proportion tested. Therefore, the results of the spike-in assay indicated that both primers were able to detect DNA from *Crithidia* sp. LVH60A and *L. infantum* in a co-infection scenario.

In this study, we present specific targets that discriminate parasite protozoa present in clinical samples of VL. We suggest the use of PCR with primer sets LinJ31seq and Crid2.1seq, as well as qPCR with LinJ31_2420 and Catalase-LVH60-12060_1F for parasite identification. It is important to consider the targets chosen for qPCR diagnosis, opting for species-specific genes such as those described here. For instance, the use of kDNA as a target may offer non-robust data due to the heterogeneity present in the minicircles, and the number of copies varies between kinetoplasts. In addition, the use of constitutive genes as targets, such as SSU rDNA [72], cannot precisely discriminate the species. For instance, a primer based on the 18S rRNA region may cross-amplify with other trypanosomatids, as described by Filgueira et al. [73].

Studies have reinforced the importance of molecular methods in becoming a reliable alternative in the diagnostic routine for leishmaniasis, especially for cases in which the patient has a low parasite load. This will enable rapid identification of the protozoan species causing infections and determination of treatment options. [69,74]. Our study focused on parasite detection using a dye-based method, which is cheaper than probe-based method but implies the need for several singleplex reactions to identify each suspect species, which is a drawback. Multiplex qPCR systems enable the simultaneous detection of multiple genes in a single reaction being advantageous because they are less time-consuming; however,

they require extensive protocol optimization and expensive probes. The targets studied here can be future be exploited by others for the development of a multiplex system.

Parasite load in bone marrow samples from patients with VL was successfully estimated using LinJ31_2420 and Catalase-LVH60_12060_1F primers with a limit of detection estimated in 1×10^1 parasites in 6 ng of DNA (Cq 30.0–0.8). Using the Catalase-LVH60_12060_1F primer, it was possible to detect and estimate the number of parasites in samples BMVL1, BMVL12, and BMVL60, indicating the presence of two species in these samples, *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A (Figure 7).

Recently, Rogerio et al. [24] reported a case of severe VL in a male child patient, in which co-infection of *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A was observed. Here, we used the same clinical isolate culture, the LVH117 strain (isolated from bone marrow), to demonstrate the ability of this novel parasite to infect human macrophages through the in vitro infection of THP-1 cells (Figure 5b and Supplementary Figure S7f). The BMVL60 sample refers to the case reported for the first time in a study by Maruyama et al. [28], in which it was coded as LVH60. Through phylogenetic analysis using small subunit rRNA (ssrRNA) sequences (Figure S10, Supplementary Material), we observed that this patient was co-infected with *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A. It was possible to corroborate this co-infection using qPCR with LinJ31_2420 and Catalase-LVH60_12060_1F primers (Figure 7a). Co-infection with monoxenic trypanosomatids in patients with leishmaniasis has been reported in studies [20,33–35,67,75,76] since the 1980s. To clarify the frequency of these cases and their association with treatment resistance and epidemiology in leishmaniasis, new cases should be researched in depth, and further examination of the likely function of these monoxenous trypanosomatids in the pathology of disease should be performed.

In conclusion, using the molecular approach presented in this study, we standardized and evaluated new species-specific targets for *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A parasites with the ability to detect and estimate parasite load in samples from different hosts involved in infection (human, animal, and experimental) and can be used for epidemiological studies, parasite load monitoring, and therapeutic follow-up. For diagnostics, these primers can be helpful, predominantly for the elucidation of VL cases of co-infection with *Crithidia* parasites. Finally, all investigations that place *Crithidia* within the context of the leishmaniasis spectrum need to be further addressed, raising questions about the influence of *Crithidia* infection on epidemiology, clinical symptoms, and treatment resistance.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/tropicalmed8080405/s1>. Figure S1: The dissociation curve and amplification plot were generated using the LinJ31_2420 and LinJ31_L42486.1 primers. Figure S2: Specificity of the Catalase_LVH60-12060_1F primer. Figure S3: qPCR assay with the Catalase_LVH60-12060_1F primer pair. Figure S4: Standard curve with DNA from the HUUF14 strain (*L. infantum*) with the LinJ31_2420 primer. Figure S5: Standard curve with DNA from the LVH60_C3 strain (*Crithidia* sp. LVH60A) with the Catalase_LVH60-12060_1F primer. Figure S6: Pearson's correlation of post-infection times with HUUF14 (*L. infantum*) using primers LinJ31_2420 and LinJ31_L42486.1. Figure S7: THP-1 macrophages infected with the HUUF14 strain (*L. infantum*), LVH60a_C1, LVH117_C1 (*Crithidia* sp. LVH60A), and TCC039E (*C. fasciculata*). Figure S8: Agarose gel electrophoresis (1%) of amplifications with Crid2.1seq and the LVH60a_Tig001 primer. Figure S9: Electrophoresis in agarose gel (1%) of conventional PCR performed with samples of LV patients from HUUF14. Figure S10: Phylogenetic analyses of small subunit rRNA (ssrRNA) sequences from LVH60 patient samples. Figure S11: Phylogenetic tree with TRY927/SSU561 rRNA sequences detected in bone marrow and peripheral blood samples of dogs with VL. Figure S12: Amplification plot with the LinJ31_2420 primer in sandfly samples determined by qPCR. Table S1: Calculations of DNA mass equivalent to one parasite. Table S2: Serial dilution for the qPCR standard curve according to the calculation of the DNA mass equivalent to one parasite of *L. infantum* and *Crithidia* sp. LVH60A; Table S3: Table of proportions of the number of parasites for the spike-in assay; Table S4: Information of the gene ID, chromosome, location genome, and the number of copies of p-nitrophenylphosphatase putative gene in *Leishmania* spp. Table S5: Information of the gene ID, chromosome, location genome, number copies of the catalase gene in *Crithidia* sp., LVH60A (LVH60a), *C. fasciculata*, and *Leptomonas* spp.

Table S6: Coefficient values for qPCR standard curves using host DNA as the background for the reactions. Assays were performed in two qPCR instruments of different brands with curves set up at six points in 10-fold serial dilutions. Table S7: PCR results with species-specific primers and molecular typing by Sanger sequencing. Table S8: PCR results with LinJ31seq and Crid2.1seq and molecular typing by Sanger sequencing of clinical isolates. Table S9: Accession numbers of small subunit rRNA (ssrRNA) sequences used in phylogenetic analysis are displayed in Supplementary Figures S8 and S9.

Author Contributions: Conceptualization: S.R.M.; methodology: S.R.M., N.T.T., J.M.C.R., F.R.T., C.T., J.A.F.L., G.V., K.C.V., G.N.P., T.S.F., R.P.D.A. and J.M.C.R.; data analysis: S.R.M., N.T.T., C.T., T.M.F.d.S.O., K.C.V., I.K.F.d.M.S., G.N.P., C.H.N.C., D.L.C., T.S.F., R.G.-G. and L.A.R.; validation: N.T.T. and L.A.R.; clinical samples collection and clinical data management: R.P.D.A., J.S.d.S., C.H.N.C. and D.L.C. Collection of samples from host animals and management of animal data: J.A.F.L., G.V. and T.M.F.d.S.O.; experiments in animal models: K.C.V., G.N.P. and I.K.F.d.M.S.; collection and processing of sandfly samples: T.S.F. and R.G.-G. Resources: S.R.M., F.R.T., J.S.d.S. and R.P.D.A. Funding acquisition: S.R.M. and F.R.T.; data curation: N.T.T., L.A.R. and C.T.; writing—preparation of the original draft: S.R.M. and N.T.T.; writing—proofreading and editing: S.R.M., N.T.T., J.M.C.R. and L.A.R.; visualization: S.R.M., N.T.T., R.P.D.A., J.S.d.S. and J.M.C.R.; supervision: S.R.M.; project management: S.R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under agreement 2016/20258-0 (Young Investigator Award to S.R.M.). N.T.T. received scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 133661/2020-2) and FAPESP (2021/12464-8). L.A.R. received scholarships from FAPESP (2018/26799-9 and 2020/14011-8). C.T. received a scholarship from FAPESP (2021/10358-6). S.R.M. received a fellowship from FAPESP (2017/16328-6). G.N.P. received a fellowship from FAPESP (2016/18527-3). I.K.F.M.S. received a research grant from FAPESP (2019/19789-0). F.R.T. received a research grant from FAPESP (2020/15771-6). J.M.C.R. was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Vector-Borne Diseases: Biology of Vector Host Relationship, Z01AI000810-18). N.T.T., L.A.R., J.A.F.L., G.V., K.C.V. and T.S.F., received support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through Post-Graduate Programs (code 001).

Institutional Review Board Statement: The samples collected from patients were carried out in accordance with the guidelines of the Brazilian System for the Evaluation of Ethics in Research with Human Beings (CEP/CONEP) and approved by the Local Ethics Committees (Federal University of Sergipe, Aracajú, SE, Brazil, approved protocol CAAE: 04587312.2.0000.0058; Institute of Tropical Diseases Natan Portela, Teresina, PI, Brazil, approval protocol CAAE: 0116.0.045.203-05). Animal sample collection was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Faculty of Zootechnics and Food Engineering of the University of São Paulo (FZEA-USP) under registrations 6147100518, 7627010517, and 8541011019. Procedures for the infections in hamsters (*Mesocricetus auratus*) were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (CEUA-FMRP/USP) (process number 234/201). The vectors were collected at sites designated by the entomological surveillance of the municipality from Rio Verde de Mato Grosso, authorized by the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO), registered license number 33156-2.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all participants involved in the study or their legal guardians.

Data Availability Statement: All data supporting the study findings are included in this published article or in the Supplementary Material. Amplicon sequences (partial 18S rRNA) were deposited in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, accessed on 26 July 2023) under accession numbers OR228484-OR228495 and OR250364-OR250401, and in the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena/>, accessed on 26 July 2023) under accession numbers PRJEB25557 and PRJEB25906.

Acknowledgments: We thank Lucile Floeter-Winter and the Trypanosomatid Culture Collection of the University of São Paulo (USP) for kindly providing *C. fasciculata* TCC039E, and Rodrigo Mattos dos Santos for kindly providing the *Trypanosoma cruzi* Y strain of the Culture Collection of the Infectious Diseases Laboratory (UNIPLEX) Medical School of São Paulo State University (UNESP/FMB, Botucatu, SP, Brazil). We thank Marcos Chiaratti, Iran Malavazi, Anderson Ferreira Cunha, and Marcelo Bello Cioffi for their generous and continuing support. We thank Yolanda L. Jones from the National Institutes of Health Editing Services for manuscript editing assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Azami-Conesa, I.; Gómez-Muñoz, M.T.; Martínez-Díaz, R.A. A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1101. [CrossRef] [PubMed]
2. WHO|Leishmaniasis. Available online: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (accessed on 23 March 2020).
3. Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35671. [CrossRef] [PubMed]
4. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites—Leishmaniasis. Available online: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> (accessed on 26 March 2020).
5. Michel, G.; Pomares, C.; Ferrua, B.; Marty, P. Importance of Worldwide Asymptomatic Carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in Human. *Acta Trop.* **2011**, *119*, 69–75. [CrossRef] [PubMed]
6. Gardinassi, L.G.; Garcia, G.R.; Costa, C.H.N.; Silva, V.C.; Santos, I.K.F. de M. Blood Transcriptional Profiling Reveals Immunological Signatures of Distinct States of Infection of Humans with *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005123. [CrossRef]
7. Maruyama, S.R.; Fuzo, C.A.; Oliveira, A.E.R.; Rogerio, L.A.; Takamiya, N.T.; Pessenda, G.; de Melo, E.V.; da Silva, A.M.; Jesus, A.R.; Carregaro, V.; et al. Insight Into the Long Noncoding RNA and mRNA Coexpression Profile in the Human Blood Transcriptome Upon *Leishmania infantum* Infection. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 784463. [CrossRef]
8. Visceral Leishmaniasis—PAHO/WHO|Pan American Health Organization. Available online: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis> (accessed on 19 January 2022).
9. Thakur, S.; Joshi, J.; Kaur, S. Leishmaniasis Diagnosis: An Update on the Use of Parasitological, Immunological and Molecular Methods. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* **2020**, *44*, 253–272. [CrossRef]
10. Reimão, J.Q.; Coser, E.M.; Lee, M.R.; Coelho, A.C. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1632. [CrossRef]
11. Sudarshan, M.; Singh, T.; Singh, A.K.; Chourasia, A.; Singh, B.; Wilson, M.E.; Chakravarty, J.; Sundar, S. Quantitative PCR in Epidemiology for Early Detection of Visceral Leishmaniasis Cases in India. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3366. [CrossRef]
12. Ghosh, P.; Chowdhury, R.; Maruf, S.; Picado, A.; Hossain, F.; Owen, S.I.; Nath, R.; Baker, J.; Hasnain, M.G.; Shomik, M.S.; et al. Gauging the Skin Resident *Leishmania* Parasites through a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay in Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18069. [CrossRef]
13. Adams, E.R.; Schoone, G.; Versteeg, I.; Gomez, M.A.; Diro, E.; Mori, Y.; Perlee, D.; Downing, T.; Saravia, N.; Assaye, A.; et al. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00386-18. [CrossRef]
14. Nzelu, C.O.; Kato, H.; Peters, N.C. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): An Advanced Molecular Point-of-Care Technique for the Detection of *Leishmania* Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007698. [CrossRef] [PubMed]
15. de Paiva-Cavalcanti, M.; de Moraes, R.C.; Pessoa-e-Silva, R.; Trajano-Silva, L.A.; Goncalves-de-Albuquerque, S.D.; Tavares, D.D.; Brelaz-de-Castro, M.C.; Silva, R.D.; Pereira, V.R. Leishmaniasis Diagnosis: An Update on the Use of Immunological and Molecular Tools. *Cell Biosci.* **2015**, *5*, 31. [CrossRef] [PubMed]
16. Porcino, G.N.; Carvalho, K.S.S.; Braz, D.C.; Silva, V.C.; Costa, C.H.N.; de Miranda Santos, I.K.F. Evaluation of Methods for Detection of Asymptomatic Individuals Infected with *Leishmania infantum* in the State of Piauí, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007493. [CrossRef]
17. Sudarshan, M.; Sundar, S. Parasite Load Estimation by QPCR Differentiates between Asymptomatic and Symptomatic Infection in Indian Visceral Leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *80*, 40–42. [CrossRef]
18. Kalantari, M.; Motazedian, M.H.; Asgari, Q.; Mohammadpour, I.; Soltani, A.; Azizi, K. Co-Detection and Isolation of *Leishmania* and *Crithidia* among Naturally Infected Tatera Indica (Rodentia: Muridae) in Fars Province, Southern Iran. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2018**, *8*, 279. [CrossRef]
19. Boucinha, C.; Andrade-Neto, V.V.; Ennes-Vidal, V.; Branquinha, M.H.; dos Santos, A.L.S.; Torres-Santos, E.C.; d’Avila-Levy, C.M. A Stroll Through the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 804707. [CrossRef] [PubMed]
20. Ghobakhloo, N.; Motazedian, M.H.; Naderi, S.; Ebrahimi, S. Isolation of *Crithidia* Spp. from Lesions of Immunocompetent Patients with Suspected Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Trop. Med. Int. Health* **2019**, *24*, 116–126. [CrossRef]
21. Mirzapour, A.; Badirzadeh, A.; Ashrafmansouri, M.; Behniafar, H.; Norouzi, M.; Azizi, H.; Behravan, M.; Seyyed Tabaei, S.J. Super Infection of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Major and *L. Tropica* to *Crithidia fasciculata* in Shiraz, Iran. *Iran. J. Public Health* **2019**, *48*, 2285–2292. [CrossRef]
22. Doudi, M.; Karami, M.; Eslami, G.; Setorki, M. A Study of Genetic Polymorphism of *Crithidia* in Isfahan, Iran. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* **2015**, *17*. [CrossRef]

23. Kalantari, M.; Motazedian, M.H.; Asgari, Q.; Soltani, A.; Mohammadpour, I.; Azizi, K. DNA-Based Detection of *Leishmania* and *Crithidia* Species Isolated from Humans in Cutaneous and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis from Shiraz and Kharameh, Southern Iran. *J. Vector Borne Dis.* **2020**, *57*, 52–57. [[CrossRef](#)]
24. Rogerio, L.A.; Takahashi, T.Y.; Cardoso, L.; Takamiya, N.T.; de Melo, E.V.; de Jesus, A.R.; de Oliveira, F.A.; Forrester, S.; Jeffares, D.C.; da Silva, J.S.; et al. Co-Infection of *Leishmania infantum* and a *Crithidia*-Related Species in a Case of Refractory Relapsed Visceral Leishmaniasis with Non-Ulcerated Cutaneous Manifestation in Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* **2023**, *133*, 85–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fakhar, M.; Derakhshani-nia, M.; Gohardehi, S.; Karamian, M.; Hezarjaribi, H.Z.; Mohebbali, M.; Akhoundi, B.; Sharbatkhori, M. Domestic Dogs Carriers of *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica* and *Crithidia fasciculata* as Potential Reservoirs for Human Visceral Leishmaniasis in Northeastern Iran. *Vet. Med. Sci.* **2022**, *8*, 2329–2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dario, M.A.; Lisboa, C.V.; Silva, M.V.; Herrera, H.M.; Rocha, F.L.; Furtado, M.C.; Moratelli, R.; Rodrigues Roque, A.L.; Jansen, A.M. *Crithidia* Mellificae Infection in Different Mammalian Species in Brazil. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2021**, *15*, 58–69. [[CrossRef](#)]
27. Songumpai, N.; Promrangsee, C.; Noopetch, P.; Siriyasatien, P.; Preativatanyou, K. First Evidence of Co-Circulation of Emerging *Leishmania Martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* Sp. in Culicoides Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae), the Putative Vectors for Autochthonous Transmission in Southern Thailand. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Maruyama, S.R.; de Santana, A.K.M.; Takamiya, N.T.; Takahashi, T.Y.; Rogerio, L.A.; Oliveira, C.A.B.; Milanezi, C.M.; Trombela, V.A.; Cruz, A.K.; Jesus, A.R.; et al. Non-*Leishmania* parasite in fatal visceral leishmaniasis-like disease, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 2088. [[CrossRef](#)]
29. Escalona-Montaña, A.R.; Ortiz-Lozano, D.M.; Rojas-Bernabé, A.; Wilkins-Rodríguez, A.A.; Torres-Guerrero, H.; Mondragón-Flores, R.; Mondragón-Gonzalez, R.; Becker, I.; Gutiérrez-Kobeh, L.; Aguirre-García, M.M. *Leishmania mexicana*: Promastigotes and Amastigotes Secrete Protein Phosphatases and This Correlates with the Production of Inflammatory Cytokines in Macrophages. *Parasitology* **2016**, *143*, 1409–1420. [[CrossRef](#)]
30. de Almeida-Amaral, E.E.; Belmont-Firpo, R.; Vannier-Santos, M.A.; Meyer-Fernandes, J.R. *Leishmania Amazonensis*: Characterization of an Ecto-Phosphatase Activity. *Exp. Parasitol.* **2006**, *114*, 334–340. [[CrossRef](#)]
31. Horáková, E.; Faktorová, D.; Kraeva, N.; Kaur, B.; Abbeele, J.V.D.; Yurchenko, V.; Lukeš, J. Catalase Compromises the Development of the Insect and Mammalian Stages of *Trypanosoma Brucei*. *FEBS J.* **2020**, *287*, 964–977. [[CrossRef](#)]
32. Kraeva, N.; Horáková, E.; Kostygov, A.Y.; Korény, L.; Butenko, A.; Yurchenko, V.; Lukeš, J. Catalase in *Leishmaniinae*: With Me or against Me? *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *50*, 121–127. [[CrossRef](#)]
33. Thakur, L.; Kushwaha, H.R.; Negi, A.; Jain, A.; Jain, M. *Leptomonas Seymouri* Co-Infection in Cutaneous Leishmaniasis Cases Caused by *Leishmania Donovanii* From Himachal Pradesh, India. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
34. Ghosh, S.; Banerjee, P.; Sarkar, A.; Datta, S.; Chatterjee, M. Coinfection of *Leptomonas Seymouri* and *Leishmania Donovanii* in Indian Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2774–2778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Srivastava, P.; Prajapati, V.K.; Vanaerschot, M.; Van der Auwera, G.; Dujardin, J.C.; Sundar, S. Detection of *Leptomonas* Sp. Parasites in Clinical Isolates of Kala-Azar Patients from India. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2010**, *10*, 1145–1150. [[CrossRef](#)]
36. Barazesh, A.; Motazedian, M.H.; Fouladvand, M.; Hatam, G.; Tajbakhsh, S.; Ebrahimi, S.; Purkamal, D. Molecular Identification of Species Caused Cutaneous Leishmaniasis in Southern Zone of Iran. *J. Arthropod-Borne Dis.* **2019**, *13*, 198–205. [[CrossRef](#)]
37. Rogers, M.B.; Hilley, J.D.; Dickens, N.J.; Wilkes, J.; Bates, P.A.; Depledge, D.P.; Harris, D.; Her, Y.; Herzyk, P.; Imamura, H.; et al. Chromosome and Gene Copy Number Variation Allow Major Structural Change between Species and Strains of *Leishmania*. *Genome Res.* **2011**, *21*, 2129–2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Aslett, M.; Aurrecochea, C.; Berriman, M.; Brestelli, J.; Brunk, B.P.; Carrington, M.; Depledge, D.P.; Fischer, S.; Gajria, B.; Gao, X.; et al. TriTrypDB: A Functional Genomic Resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D457–D462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 134. [[CrossRef](#)]
40. Vioti, G.; da Silva, M.D.; Galvis-Ovallos, F.; Alves, M.L.; da Silva, D.T.; Leonel, J.A.F.; Pereira, N.W.B.; Benassi, J.C.; Spada, J.C.P.; Maia, C.; et al. Xenodiagnosis in Four Domestic Cats Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**. [[CrossRef](#)]
41. Novy, F.G.; McNeal, W.J. On the Cultivation of *Trypanosoma Brucei*. *J. Infect. Dis.* **1904**, *1*, 1–30. [[CrossRef](#)]
42. Luz, Z.M.; Coutinho, M.G.; Cançado, J.R.; Kretzli, A.U. Hemoculture: Sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1994**, *27*, 143–148. [[CrossRef](#)]
43. Vallur, A.C.; Duthie, M.S.; Reinhart, C.; Tutterrow, Y.; Hamano, S.; Bhaskar, K.R.H.; Coler, R.N.; Mondal, D.; Reed, S.G. Biomarkers for Intracellular Pathogens: Establishing Tools as Vaccine and Therapeutic Endpoints for Visceral Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20*, O374–O383. [[CrossRef](#)]
44. Hossain, F.; Ghosh, P.; Khan, M.A.A.; Duthie, M.S.; Vallur, A.C.; Picone, A.; Howard, R.F.; Reed, S.G.; Mondal, D. Real-Time PCR in Detection and Quantitation of *Leishmania Donovanii* for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Patients and the Monitoring of Their Response to Treatment. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Ghosh, P.; Hasnain, M.G.; Hossain, F.; Khan, M.A.A.; Chowdhury, R.; Faisal, K.; Mural, M.A.; Baker, J.; Nath, R.; Ghosh, D.; et al. Evaluation of Real-Time PCR for Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in Endemic Foci of Bangladesh. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
46. Chowdhury, R.; Ghosh, P.; Khan, M.A.A.; Hossain, F.; Faisal, K.; Nath, R.; Baker, J.; Wahed, A.A.E.; Maruf, S.; Nath, P.; et al. Evaluation of Rapid Extraction Methods Coupled with a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Point-of-Need Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2020**, *5*. [CrossRef]
47. Chin Yuan, C.; Miley, W.; Waters, D. A Quantification of Human Cells Using an ERV-3 Real Time PCR Assay. *J. Virol. Methods* **2001**, *91*, 109–117. [CrossRef]
48. Adai, V.; Verdonck, K.; Best, I.; González, E.; Tipismana, M.; Arévalo, J.; Vanham, G.; Campos, M.; Zimic, M.; Gotuzzo, E. SYBR Green–Based Quantitation of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Proviral Load in Peruvian Patients with Neurological Disease and Asymptomatic Carriers: Influence of Clinical Status, Sex, and Familial Relatedness. *J. Neurovirol.* **2006**, *12*, 456–465. [CrossRef]
49. Barker, E.N.; Tasker, S.; Day, M.J.; Warman, S.M.; Woolley, K.; Birtles, R.; Georges, K.C.; Ezeokoli, C.D.; Newaj-Fyzul, A.; Campbell, M.D.; et al. Development and Use of Real-Time PCR to Detect and Quantify *Mycoplasma Haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma Haematoparvum*” in Dogs. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 167–170. [CrossRef] [PubMed]
50. Reis, L.E.S.; Coura-Vital, W.; Roatt, B.M.; Bouillet, L.É.M.; Ker, H.G.; de Brito, R.C.F.; de Melo Resende, D.; Carneiro, M.; Giunchetti, R.C.; Marques, M.J.; et al. Molecular Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis: A Comparative Study of Three Methods Using Skin and Spleen from Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. *Vet. Parasitol.* **2013**, *197*, 498–503. [CrossRef]
51. Lins, R.M.M.A.; Oliveira, S.G.; Souza, N.A.; de Queiroz, R.G.; Justiniano, S.C.B.; Ward, R.D.; Kyriacou, C.P.; Peixoto, A.A. Molecular Evolution of the Cacophony IVS6 Region in Sandflies. *Insect Mol. Biol.* **2002**, *11*, 117–122. [CrossRef]
52. Peacock, C.S.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J.C.; Quail, M.A.; 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*, 839–847. [CrossRef]
53. Shapiro, T.A.; Englund, P.T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 117–143. [CrossRef]
54. Takahashi, T.Y. Triagem de Isolados Clínicos de *Leishmania* sp. para Sequenciamento Genômico. Available online: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/8195/browse?type=author&value=Takahashi%2C+Talita+Yuri> (accessed on 30 April 2021).
55. Venkataraman, A.; Parlov, M.; Hu, P.; Schnell, D.; Wei, X.; Tiesman, J.P. Spike-in Genomic DNA for Validating Performance of Metagenomics Workflows. *BioTechniques* **2018**, *65*, 315–321. [CrossRef]
56. Jara, M.; Adai, V.; Valencia, B.M.; Martinez, D.; Alba, M.; Castrillon, C.; Cruz, M.; Cruz, I.; Van der Auwera, G.; Llanos-Cuentas, A.; et al. 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**, *51*, 1826–1833. [CrossRef]
57. Noyes, H.; Stevens, J.R.; Teixeira, M.; Phelan, J.; Holz, P. A Nested PCR for the SsrRNA Gene Detects *Trypanosoma Binneyi* in the Platypus and *Trypanosoma* Sp. in Wombats and Kangaroos in Australia1. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 331–339. [CrossRef] [PubMed]
58. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [CrossRef] [PubMed]
59. Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int. J. Cancer* **1980**, *26*, 171–176. [CrossRef] [PubMed]
60. de Sousa Ferreira, T.; Timbó, R.V.; Minuzzi-Souza, T.T.C.; de Almeida Rocha, D.; Neiva, M.; de Albuquerque Ribeiro, J.; de Almeida, P.S.; Hecht, M.; Nitz, N.; Gurgel-Gonçalves, R. High Molecular Prevalence of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies Fed on Chicken Blood in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2018**, *259*, 80–84. [CrossRef]
61. Dantas-Torres, F.; da Silva Sales, K.G.; Gomes da Silva, L.; Otranto, D.; Figueredo, L.A. *Leishmania*-FAST15: A Rapid, Sensitive and Low-Cost Real-Time PCR Assay for the Detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania Braziliensis* Kinetoplast DNA in Canine Blood Samples. *Mol. Cell. Probes* **2017**, *31*, 65–69. [CrossRef]
62. Caraguel, C.G.B.; Stryhn, H.; Gagné, N.; Dohoo, I.R.; Hammell, K.L. Selection of a Cutoff Value for Real-Time Polymerase Chain Reaction Results to Fit a Diagnostic Purpose: Analytical and Epidemiologic Approaches. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* **2011**, *23*, 2–15. [CrossRef]
63. Domagalska, M.A.; Dujardin, J.-C. Comment letter: Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis-like Disease, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 388. [CrossRef]
64. Sundar, S.; Singh, O.P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol. Diagn. Ther.* **2018**, *22*, 443–457. [CrossRef]
65. Rezaei, Z.; Azarang, E.; Shahabi, S.; Omidian, M.; Pourabbas, B.; Sarkari, B. *Leishmania* ITS1 Is Genetically Divergent in Asymptomatic and Symptomatic Visceral Leishmaniasis: Results of a Study in Southern Iran. *J. Trop. Med.* **2020**, *2020*, 5351098. [CrossRef]
66. Yurchenko, V.; Butenko, A.; Kostygov, A.Y. Genomics of Trypanosomatidae: Where We Stand and What Needs to Be Done? *Pathogens* **2021**, *10*, 1124. [CrossRef] [PubMed]
67. Kraeva, N.; Butenko, A.; Hlaváčová, J.; Kostygov, A.; Myšková, J.; Grybchuk, D.; Leštinová, T.; Votýpka, J.; Volf, P.; Opperdoes, F.; et al. *Leptomonas Seymouri*: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-Infection with *Leishmania Donovanii*. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005127. [CrossRef]

68. Pereira, L.Q.; Ferreira-Silva, M.M.; Ratkevicius, C.M.A.; Gómez-Hernández, C.; Vito, F.B.D.; Tanaka, S.C.S.V.; Júnior, V.R.; Moraes-Souza, H. Identification of *Leishmania infantum* in Blood Donors from Endemic Regions for Visceral Leishmaniasis. *Parasitology* **2021**, *148*, 110–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Weirather, J.L.; Jeronimo, S.M.B.; Gautam, S.; Sundar, S.; Kang, M.; Kurtz, M.A.; Haque, R.; Schriefer, A.; Talhari, S.; Carvalho, E.M.; et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3892–3904. [[CrossRef](#)]
70. Pita-Pereira, D.; Lins, R.; Oliveira, M.P.; Lima, R.B.; Pereira, B.A.; Moreira, O.C.; Brazil, R.P.; Britto, C. SYBR Green-Based Real-Time PCR Targeting Kinetoplast DNA Can Be Used to Discriminate between the Main Etiologic Agents of Brazilian Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Parasit. Vectors* **2012**, *5*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Zampieri, R.A.; Laranjeira-Silva, M.F.; Muxel, S.M.; Stocco de Lima, A.C.; Shaw, J.J.; Floeter-Winter, L.M. High Resolution Melting Analysis Targeting Hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of Leishmania Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. de Paiva Cavalcanti, M.; Dantas-Torres, F.; da Cunha Gonçalves de Albuquerque, S.; Silva de Moraes, R.C.; de Brito, M.E.F.; Otranto, D.; Brandão-Filho, S.P. Quantitative Real Time PCR Assays for the Detection of Leishmania (Viannia) Braziliensis in Animals and Humans. *Mol. Cell. Probes* **2013**, *27*, 122–128. [[CrossRef](#)]
73. Filgueira, C.P.B.; Moreira, O.C.; Cantanhêde, L.M.; de Farias, H.M.T.; Porrozzi, R.; Britto, C.; Boité, M.C.; 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*, e0008750. [[CrossRef](#)]
74. Reina, A.M.; Mewa, J.C.; Calzada, J.E.; Saldaña, A. Characterization of Leishmania Spp. Causing Cutaneous Lesions with a Negative Parasitological Diagnosis in Panama. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 282. [[CrossRef](#)]
75. Singh, N.; Chikara, S.; Sundar, S. SOLiD™ Sequencing of Genomes of Clinical Isolates of Leishmania Donovanii from India Confirm *Leptomonas* Co-Infection and Raise Some Key Questions. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55738. [[CrossRef](#)]
76. Dedet, J.-P.; Pratlong, F. Leishmania, Trypanosoma and Monoxenous Trypanosomatids as Emerging Opportunistic Agents. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2000**, *47*, 37–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.