

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS LABORATORIAIS APLICADA À VIGILÂNCIA MOLECULAR DE *Leishmania* spp.

Gabrielle dos Santos Rocha¹
José Eduardo Tolezano²
Vanessa Campos Paizan³
Valéria Medina Camprigher⁴
Gabrielle Pires de Moraes Monari⁵
Laís Ferreira Inácio³
Henrique Gualtieri Crisci³
Luciana da Silva Ruiz²
Virginia Bodelão Richini-Pereira⁶

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses vetoriais negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública. A Leishmaniose Visceral (LV), causada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta ampla distribuição em áreas urbanas, tendo o cão doméstico como principal reservatório. Este estudo objetivou padronizar, comparar e otimizar diferentes meios de cultura, volumes de cultivo e métodos de extração de DNA, associados a técnicas moleculares, visando aprimorar a vigilância molecular da *Leishmania* spp., principalmente em regiões endêmicas. Foram analisadas amostras biológicas de 15 cães naturalmente infectados e reagentes para LV em inquérito sorológico no município de Bauru, São Paulo, Brasil. Amostras de soro apresentaram 100% de positividade no teste *Dual Path Platform* (DPP) e 86,7% no ensaio imunoenzimático (ELISA). Punções de linfonodo, baço, fígado e medula óssea foram cultivadas em diferentes meios: bifásico NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) + BHI (Infusão de Cérebro e Coração) suplementado com gentamicina e urina; bifásico BAB (*Blood Agar Base*) + *Schneider*, BHI e soro fetal bovino; em meio M199 suplementado com soro fetal bovino, gentamicina e urina; e em meio LIT (Infusão de Fígado e Triptose), sendo estes últimos avaliados em volumes de 8 mL e 600 µL. O volume reduzido apresentou melhor desempenho no isolamento de promastigotas, especialmente no meio M199. O DNA foi extraído a partir de alíquotas das culturas por métodos manual e automatizado, sendo observadas maiores concentrações de ácidos nucleicos nas extrações automatizadas. Na PCR convencional (cPCR), utilizando *primers* LinR4 e Lin19, verificou-se positividade de 77% nas extrações manuais e 96% nas automatizadas. Os resultados demonstram o potencial das condições laboratoriais avaliadas para aprimorar o isolamento parasitário e a detecção molecular de *Leishmania* spp. em cães, contribuindo para a otimização e padronização de protocolos laboratoriais aplicados à vigilância molecular em áreas endêmicas.

Palavras-chave: Leishmaniose; Técnicas de Cultura; Diagnóstico Molecular; Reação em Cadeia da Polimerase; Vigilância em Saúde Pública.

OPTIMIZATION OF LABORATORY PROTOCOLS APPLIED TO THE MOLECULAR SURVEILLANCE OF *Leishmania* spp.

¹ Discente do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional II, Bauru, gabriellerocha13@gmail.com

² Pesquisador, Docente do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, São Paulo, tolezano@hotmail.com

³ Mestranda do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional II, Bauru. camposvanessamv@gmail.com

⁴ Secretária da Saúde, Prefeitura Municipal de Bauru. valeriacamprigher@bauru.sp.gov.br

⁵ Doutoranda do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional II, Bauru, gabrielle.monari@gmail.com

⁶ Diretora, Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional II, Bauru. Correspondência: virichini@yahoo.com.br

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected vector-borne zoonosis diseases and represent an important public health problem. Visceral Leishmaniasis (VL), caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is endemic in urban areas, with the domestic dog as the main reservoir. This study aimed to standardize, compare, and optimize different culture media, culture volumes, and DNA extraction methods associated with molecular techniques in order to improve the molecular surveillance of *Leishmania* spp., especially in endemic regions. Biological samples from 15 naturally infected dogs reactive for VL in a serological survey conducted in the municipality of Bauru, São Paulo State, Brazil, were analyzed. Serum samples showed 100% positivity in the Dual Path Platform (DPP) test and 86.7% in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lymph node, spleen, liver, and bone marrow needle-aspirates were cultured in different media: biphasic NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) + BHI (Brain Heart Infusion) supplemented with gentamicin and urine; biphasic BAB (Blood Agar Base) + Schneider, BHI, and fetal bovine serum; M199 supplemented with fetal bovine serum, gentamicin, and urine; and in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium, the latter two tested with volumes of 8 mL and 600 μ L. Reduced culture volume showed better performance for promastigotes isolation, especially in M199 medium. DNA was extracted from culture aliquots using manual and automated methods, with the automated method resulting in higher nucleic acid concentrations. Conventional PCR (cPCR) using the LinR4 and Lin19 primers showed positivity rate of 77% in manually extracted and 96% in automated extractions. The results demonstrate the potential of the evaluated laboratory conditions to improve parasite isolation and molecular detection of *Leishmania* spp. in dogs, contributing to the optimization and standardization of laboratory protocols applied to molecular surveillance in endemic areas.

Keywords: Leishmaniasis; Culture Techniques; Molecular Diagnosis; Polymerase Chain Reaction; Public Health Surveillance.

OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE LABORATORIO APLICADOS A LA VIGILANCIA MOLECULAR DE *Leishmania* spp.

RESUMEN

Las leishmaniasis son zoonosis vectoriales desatendidas y representan un importante problema de salud pública. La Leishmaniasis Visceral (LV), causada por protozoarios del género *Leishmania* es endémica en áreas urbanas, teniendo al perro doméstico como principal reservorio. Este estudio tuvo como objetivo estandarizar, comparar y optimizar diferentes medios de cultivo, volúmenes de cultivo y métodos de extracción de ADN asociados a técnicas moleculares, buscando mejorar la vigilancia molecular de *Leishmania* spp., principalmente en regiones endémicas. Se analizaron muestras biológicas de 15 perros naturalmente infectados y reactivos para LV en un estudio serológico en el municipio de Bauru, São Paulo, Brasil. Las muestras de suero presentaron 100% de positividad en la prueba *Dual Path Platform* (DPP) y 86,7% en el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las punciones aspirativas de ganglio linfático, bazo, hígado y médula ósea fueran cultivados em diferentes médios: bifásico NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) + BHI (*Infusión Cerebro Corazón*) suplementado con gentamicina y orina; bifásico BAB (*Blood Agar Base*) + Schneider, BHI y suero fetal bovino; M199 suplementado con suero fetal bovino, gentamicina y orina; y medio LIT (*Infusión de Hígado y Triptosa*), evaluándose estos dos últimos en volúmenes de 8 mL y 600 μ L. El volumen reducido presentó mejor desempeño en el aislamiento de promastigotas,

especialmente en el medio M199. El ADN fue extraído a partir de alícuotas de los cultivos mediante métodos manuales y automatizados, observándose mayores concentraciones de ácidos nucleicos em las extracciones automatizadas. En la PCR convencional (cPCR) con *primers* LinR4 y Lin19, se observó una positividad del 77% en las extracciones manuales y del 96% en las automatizadas. Los resultados demuestran el potencial de las condiciones laboratoriales evaluadas para mejorar el aislamiento parasitario y la detección molecular de *Leishmania* spp. en perros, contribuyendo a la optimización y estandarización de protocolos de laboratoriales aplicados a la vigilancia molecular en áreas endémicas.

Palabras clave: Leishmaniasis; Técnicas de Cultivo; Diagnóstico Molecular; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Vigilancia en Salud Pública.

INTRODUÇÃO

O conceito de *One Health* ou “Saúde Única” refere-se a uma abordagem que reconhece a saúde humana como intrinsecamente conectada à saúde animal e ao meio ambiente, sendo particularmente relevante para a prevenção, previsão, detecção e resposta a ameaças globais à saúde (1). A ocorrência de doenças infecciosas emergentes e reemergentes tem sido impulsionada por múltiplos fatores, incluindo alterações ambientais, mudanças climáticas, saúde animal e atividades antrópicas, como a urbanização, a expansão territorial e a globalização (2). Nesse contexto, as leishmanioses são zoonoses vetoriais negligenciadas, com manutenção e disseminação determinadas pela interação entre parasito, vetor, hospedeiros e fatores ambientais, configurando importante desafio à saúde pública (3). A Leishmaniose Visceral (LV) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Apresentam ciclo de vida heteróximo, com duas formas evolutivas: promastigota, forma flagelada presente no vetor biológico; e amastigota, intracelular em macrófagos do hospedeiro vertebrado (4-5). A transmissão da LV ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora no Brasil. De hábito hematófago, as fêmeas realizam a oviposição em solos ricos em matéria orgânica em decomposição, como bases de árvores e áreas com fezes de animais. São sensíveis a fatores climáticos e preferem ambientes úmidos e sombreados (6). O cão doméstico é considerado o principal reservatório da *Leishmania* em áreas urbanas, exercendo papel fundamental na manutenção da cadeia de transmissão. As estratégias de controle e prevenção da LV visam reduzir a morbidade e letalidade por meio do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, controle da população de reservatórios caninos e controle vetorial (5). Dentre os métodos de diagnóstico utilizados em cães, destacam-se os testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e os testes imunocromatográficos rápidos, além dos métodos parasitológicos, incluindo a pesquisa direta do parasita em amostras de linfonodo, baço e medula óssea, bem como o isolamento em meio de cultura (5). Adicionalmente, técnicas moleculares apresentam elevada performance, com alta sensibilidade e especificidade, sendo aplicadas tanto na detecção inicial quanto no monitoramento e tratamento da doença (7). Além do diagnóstico, abordagens moleculares e genômicas têm contribuído para o entendimento da variabilidade genética e dos mecanismos adaptativos de *Leishmania* spp. As espécies desse gênero apresentam plasticidade genômica, caracterizada por variações no número de cópias de genes, deleções e ampliações, que atuam como mecanismos adaptativos frente a estresses ambientais e pressão seletiva de agentes quimioterápicos, entre outros determinantes de resistência (8). Diante disso, a vigilância genômica da *Leishmania* é fundamental para o entendimento de seus processos adaptativos de resistência, visando o controle da doença. Ainda existem limitações na padronização de protocolos laboratoriais para o isolamento, à detecção e à caracterização

molecular de *Leishmania* spp., o que impacta negativamente a qualidade, a comparabilidade e a reprodutibilidade das análises moleculares. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e otimizar protocolos laboratoriais de isolamento e detecção molecular de *Leishmania* por meio da comparação entre diferentes meios de cultura, volumes de cultivo e técnicas moleculares, visando fortalecer a vigilância molecular em áreas endêmicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê Técnico-Científico do Instituto Adolfo Lutz/ SP, (CTC-IAL 33 - R/2025) e dispensado de apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), por utilizar amostras (soro, punções aspirativas de linfonodo, baço, fígado e medula óssea) de quinze cães positivos para LV, eutanasiados na Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) de Bauru/SP, conforme o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde do Brasil.

Produção dos meios de cultura

Para o cultivo das amostras obtidas por punção, foram utilizados quatro meios de cultura: meio bifásico composto por fase sólida de NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) e fase líquida de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com gentamicina e urina; meio bifásico composto por fase sólida de BAB (*Blood Agar Base*) e fase líquida composta por *Schneider*, BHI e soro fetal bovino; meio líquido M199 suplementado com soro fetal bovino, gentamicina e urina; e meio líquido LIT (*Liver Infusion Tryptose*).

Meio NNN

O meio NNN foi preparado com 1,5 g de ágar base (Bacto Ágar) e 0,66 g de cloreto de sódio (NaCl) diluídos em 100 mL de água destilada, seguido de autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento a aproximadamente 50 °C, adicionou-se 13 mL de sangue de carneiro desfibrinado, previamente inativado a 56 °C por 30 minutos. Imediatamente, 5 mL do meio foram distribuídos em tubos com tampa de rosca inclinados para a formação do bisel. Após solidificação, os tubos foram submetidos a controle de esterilidade em estufa a 35 °C por 48 horas, e armazenados sob refrigeração a 4 °C.

Meio BHI suplementado

O caldo BHI foi preparado pela dissolução de 2,2 g do meio em 100 mL de água destilada, seguido de autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 0,75 mL de sulfato de gentamicina (40 mg/mL) e 5 mL de urina masculina previamente esterilizada por autoclavagem. O meio suplementado foi distribuído em tubos contendo 2 mL cada, e armazenado a 4 °C.

Meio M199 suplementado

O meio M199 foi preparado a partir de 240 mL de meio M199 Sigma™, suplementado com 14 mL de soro fetal bovino (SFB) e 480 µL de urina masculina estéril. A urina foi previamente esterilizada por filtração em membrana de polietersulfona (PES) de 0,22 µm, sendo posteriormente adicionado sulfato de gentamicina na concentração de 200 µg/mL. A solução foi homogeneizada, fracionada em tubos cônicos estéreis de polipropileno (tipo Falcon) com 8 mL e armazenada a 4 °C.

Meio LIT

O meio LIT foi preparado em duas etapas. Inicialmente dissolveram-se 2 g de fosfato dissódico, 1 g de cloreto de sódio e 0,1 g de cloreto de potássio em 145 mL de água destilada, seguido de autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Separadamente, dissolveram-se 0,75 g de infusão de fígado, 1,25 g de triptose e 0,5 g de dextrose em 100 mL de água destilada estéril aquecida, submetida à filtração em membrana em MCE (ésteres de celulose mistos) de 0,22 µm. Em seguida, foram adicionados 5,5 mL de hemoglobina bovina a 2%. Após a retirada do filtro, acrescentaram-se 27 mL de soro fetal bovino a 11% (previamente filtrado) e 0,5 mL (2 mg) de sulfato de gentamicina. Após homogeneização, o meio foi distribuído em tubos com tampa de rosca, contendo 8 mL cada, mantido em estufa a 35 °C por 48 horas para controle de esterilidade e armazenado a 4 °C.

Meio BAB

O meio Blood Agar Base (BAB) foi preparado adicionando-se 10 g em 250 mL de água destilada, seguido de autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento da base a 50°C, foram adicionados 37,5 mL de sangue de coelho desfibrinado. Em seguida, 6 mL do meio foram distribuídos em tubos com tampa de rosca inclinados para formação do bisel.

Cultivo parasitário

Os cultivos foram realizados em cabine de segurança biológica. No meio NNN adicionaram-se 6 mL de caldo BHI, seguidos da inoculação de 200 µL da amostra, em duplicata. Para o meio BAB, adicionaram-se 200 µL *Schneider* (Sigma), 300 µL de BHI e 115 µL de Soro fetal bovino (SFB, Sigma), seguido da inoculação de 200 µL da amostra. Nos meios M199 e LIT foram utilizados dois volumes de cultivo (8 mL e 600 µL), mantendo-se constante o volume da amostra inoculada (200 µL). As culturas foram incubadas em estufa D.B.O a 25 °C por até quatro semanas, com avaliações semanais por microscopia óptica para detecção de formas promastigotas. Culturas positivas foram repicadas a cada 14 dias.

Análises sorológicas

As amostras de soro foram submetidas à análise sorológica, por meio do teste imunocromatográfico DPP® (*Dual Path Platform*, Bio-Manguinhos, Brasil) e do ensaio imunoenzimático ELISA (EIE, Bio-Manguinhos, Brasil), conforme instruções do fabricante.

Avaliação molecular

Alíquotas de 200 µL das culturas, independentemente da presença de crescimento visível, foram submetidas à extração de DNA por métodos manual e automatizado, conforme protocolos dos fabricantes.

Extração Manual

A extração manual foi realizada utilizando o kit Illustra® Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin (Cytiva), com adaptações no protocolo do fabricante. Alíquotas de 200 µL das amostras foram submetidas à lise, com 50 µL da solução de lise 1 e 10 µL de proteinase K, seguidas de incubação a 56 °C por 1 hora. Posteriormente, realizou-se a purificação em

colunas de sílica, incluindo etapas de lavagem e eluição com tampão aquecido a 70 °C. O DNA eluído foi armazenado a -80 °C até o uso.

Extração automatizada

A extração automatizada foi realizada utilizando Extracta®Kit MVXA a partir de 100 µL de amostra, utilizando o equipamento Extracta®96 Locus, conforme recomendações do fabricante.

Quantificação de ácidos nucleicos

A concentração e pureza do DNA extraído foram realizadas em Espectrofotômetro de Microplacas BioTek Epoch™, em placa Take3 e analisadas no Software Gen5. Os resultados de absorbância a 260 nm e 280 nm, a relação 260/280 e a concentração de ácidos nucleicos em ng/µL.

Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

A detecção de *Leishmania* spp. foi realizada por PCR convencional, utilizando os iniciadores LINR4 (5' -GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3'), e LIN19 (5' -CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'), direcionados a região do kDNA. As reações foram realizadas contendo 8,3 µL de água ultrapura, 1,3 µL de tampão de corrida de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,4 µL de MgCl₂ (50mM), 0,25 µL de cada *primer* (0,2µM), 0,25 µL de dNTP (0,2µM), 0,25 µL de Taq-polimerase 5U/µL (Platinum® Taq Polymerase, Invitrogen, Brasil) e 2µL do DNA extraído da amostra. A incubação foi realizada em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA), utilizando as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°, 30 s a 55°C e 1 min a 70 °C, e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% com 0,1 µL/mL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Brasil). Foram aplicados 8 µL do produto amplificado acrescidos de 2 µL do tampão de corrida (BlueJuice™ Gel Loading Buffer) e como marcador de peso molecular, utilizou-se de 100 pb (DNA Ladder Ludwig®). A corrida eletroforética foi realizada em fonte Locus® LPS-600, contendo TBE 1X, com voltagem inicial de 60V por 10 min, seguida de 100V por mais 50 min. A visualização foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (Kasvi®), e as imagens capturadas por meio de sistema portátil de documentação digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na triagem sorológica, todos os cães apresentaram resultado reagente no teste imunocromatográfico DPP. No ensaio imunoenzimático (ELISA), dois animais apresentaram resultado não reagente. Um dos animais apresentava quadro clínico característicos da forma sintomática, incluindo linfadenomegalia generalizada (poplítea, submandibular e subescapular), descamação e lesões de pele, hiperqueratose, feridas perioculares e esplenomegalia com nodulações. A ausência da reatividade sorológica pode estar relacionada à falha de soroconversão ou a comprometimento imunológico descrito em alguns animais sintomáticos que deixam de manter níveis detectáveis de anticorpos ao longo da evolução da

doença (9). O segundo animal, classificado como oligossintomático, apresentava emagrecimento e nódulos esplênicos. A dinâmica das infecções assintomáticas e oligossintomáticas ainda não está completamente elucidada, mas sugere-se que diferenças individuais na resposta imune do hospedeiro influenciem a produção e manutenção de anticorpos detectáveis (10). A recuperação de formas promastigotas apresentou diferenças conforme o meio de cultura e o volume empregado (Tabela 1). O crescimento foi observado predominantemente em culturas de meio bifásico BAB + Schneider, BHI e SFB, permitindo o isolamento de promastigotas em 100% das amostras inoculadas de linfonodo, baço, fígado e medula óssea, apresentando também maior estabilidade e manutenção da motilidade das promastigotas ao longo das semanas de incubação. Houve também bom crescimento em culturas de M199 realizadas em volume reduzido (600 µL), principalmente em punções de baço. Culturas em LIT com volume reduzido (600 µL) também apresentaram crescimento, porém com menor estabilidade durante as semanas de incubação e com ocorrência de contaminação fúngica.

As culturas realizadas em NNN + BHI (6 mL) apresentaram baixa taxa de recuperação e maior frequência de contaminação fúngica, o que comprometeu a manutenção das amostras. Já as culturas em M199 e LIT no volume de 8 mL não apresentaram crescimento parasitário durante o período avaliado.

Tabela 1. Resultado final das culturas segundo meio, volume e tipo de amostra.

Meio	Volume	Tipo de amostra	N positivas / N total	Contaminação (%)
NNN + BHI	6 ml	Linfonodo Baço	2/7 0/3	6/10 (60%)
BAB + <i>Schneider</i>	615 µL	Linfonodo Baço Fígado Medula Óssea	2/2 2/2 1/1 1/1	0/6 (0%)
M199	8 mL	Linfonodo Baço	0/2 0/3	0/5 (0%)
M199	600 µL	Linfonodo Baço Fígado Medula Óssea	1/6 4/7 1/5 0/1	0/19 (0%)
LIT	8 mL	Linfonodo Baço	0/1 0/2	0/3 (0%)
LIT	600 µL	Linfonodo Baço	1/1 2/2	1/3 (33%)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

A Figura 1 ilustra uma forma promastigota observada em cultura de punção de baço mantida em M199 (600 µL). Nessa mesma amostra, também houve crescimento em meio LIT, porém apresentando promastigotas em menor número e com baixa motilidade. Deste mesmo cão, a cultura de punção de linfonodo apresentou crescimento em meio LIT apenas na primeira semana, e não houve crescimento em M199. A contaminação fúngica também ocorreu em menores volumes de meio, representando um problema durante o estudo e um fator limitante para a cultura de *Leishmania* spp. A adição de antifúngicos aos meios de cultura pode representar uma alternativa para futuros estudos, porém com cautela. Fármacos como anfotericina B e nistatina são utilizados para redução de contaminação fúngica em

culturas celulares, tendo como alvo o ergosterol da membrana celular. De maneira semelhante, espécies de *Leishmania* apresentam esteróis de membrana relacionados ao ergosterol, o que pode interferir diretamente na viabilidade e no crescimento *in vitro* do parasito (11). O estudo de Saki *et al.* (12) demonstrou que, com a utilização de meio NNN modificado com cicloheximida e cloranfenicol, houve maior inibição de crescimento de fungos saprófitos e maior crescimento de promastigotas de *Leishmania*. No estudo de Siripattanapipong *et al.* (13), o M199 se mostrou um dos meios mais adequados para isolamento inicial de *Leishmania* em amostras clínicas, o que corrobora com nossa experiência no presente estudo. Inicialmente, utilizou-se apenas o meio bifásico NNN + BHI para o cultivo das punções. Diante das dificuldades no isolamento de promastigotas e ocorrência de contaminações fúngicas, optou-se pela inserção de outros meios de cultura e protocolos, assim como a redução do volume de cultura, estratégia que aumenta a rapidez e a sensibilidade do isolamento de *Leishmania* pela maior razão superfície/volume e menor área de contaminação (14), obtendo-se então êxito no isolamento.



Figura 1. Promastigota de *Leishmania* spp. em cultura de punção de baço em M199, visualizada em microscopia óptica de imersão (100x).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2025.

A Tabela 2 apresenta a comparação entre os valores médios de quantificação de ácidos nucleicos obtidos pela extração manual e automatizada, em associação aos resultados de positividade na cPCR. Observou-se que a extração automatizada apresentou maiores concentrações médias de ácidos nucleicos (ng/ μ L) em relação ao método manual, sugerindo maior eficiência na recuperação do material genético. De forma semelhante, Sabatier *et al.* (15) observaram melhor recuperação de ácidos nucleicos em métodos automatizados aplicados à análise metagenômica de vírus respiratórios. Na detecção molecular de *Leishmania*, Prudhomme *et al.* (16) verificaram que diferenças nos protocolos e kits de extração de DNA influenciam a sensibilidade dos métodos. Os autores observaram que a eficiência da recuperação do DNA esteve mais relacionada à qualidade e à padronização dos protocolos utilizados do que ao fato de a extração ser manual ou automatizada. Esses achados reforçam a importância da padronização dos protocolos de extração de DNA, considerando os kits disponíveis, os equipamentos utilizados e a demanda de cada laboratório. Ambos os métodos de extração apresentaram médias das razões 260/280 muito próximas a 1,8, indicando amostras de ácidos nucleicos puras, ou seja, livres de proteínas (16); tal pureza favoreceu a robustez e a alta taxa de positividade da amplificação por cPCR. Observou-se 96,3% de positividade nas amostras de extração automatizada, em relação a 77,7% nas obtidas por extração manual. Na cPCR, foram observadas diferenças na intensidade das

bandas de amostras de extração manual e automatizada. Como observado na Figura 2, amostras de extração automatizada apresentaram bandas mais intensas que as mesmas amostras extraídas pelo método manual. Isso corrobora o resultado da quantificação de ácidos nucleicos, onde as amostras automatizadas resultaram em concentrações (ng/μL) maiores, comparada ao outro método. Além disso, algumas amostras foram positivas apenas quando extraídas pelo método automatizado, como por exemplo as amostras 4 e 9 da Figura 2, que foram negativas quando extraídas manualmente, demonstrando maior sensibilidade do método automatizado. Uma limitação importante deste estudo foi sua amostragem limitada a 15 cães, ainda assim, os resultados obtidos são altamente relevantes para a padronização de protocolos laboratoriais de isolamento e detecção molecular de *Leishmania* sp.

Tabela 2. Valores médios de quantificação de ácidos nucleicos em amostras de extração manual e extração automatizada e suas respectivas porcentagens de positividade na cPCR.

Método de extração	Média relação 260/280	Média concentração ng/μL	Positividade cPCR (%)
Extração Manual	1,83	9,93	77,7%
Extração Automatizada	1,79	90,22	96,3%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

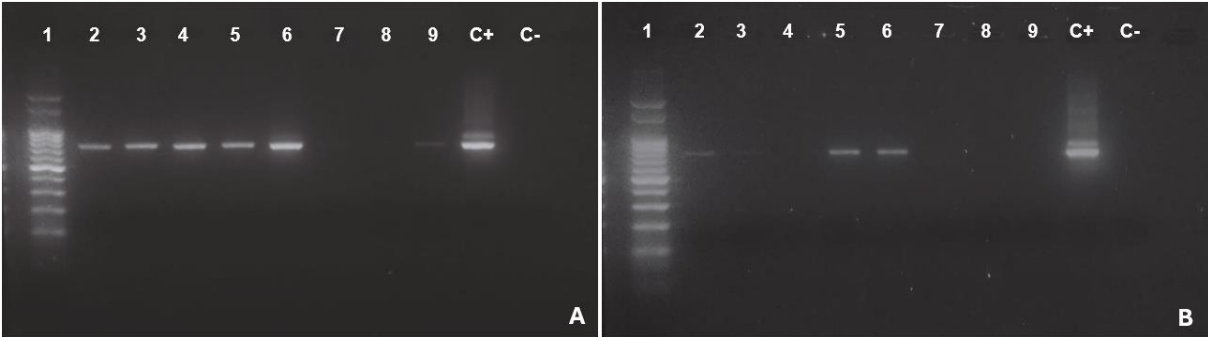


Figura 2. Géis de agarose a 1,5% utilizando os *primers* LinR4 e Lin19 720 pb. Foto A: amostras de extração automatizada; Foto B: amostras de extração manual, ambas sendo: 1) DNA Ladder Ludwig 100 pb; 2) Cultivo linfonodo em M199 cão 7; 3) Cultivo linfonodo em LIT cão 7; 4) Cultivo baço em NNN+BHI cão 7; 5) Cultivo baço em M199 cão 7; 6) Cultivo baço em LIT cão 7; 7) Cultivo baço em NNN+BHI cão 8; 8) Cultivo baço em M199 cão 8; 9) Cultivo baço em LIT cão 8; controle positivo; controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram estabelecer um protocolo inicial para o processamento de amostras clínicas de cães visando o isolamento e a investigação molecular de *Leishmania* spp. O uso do meio BAB + Schneider e de pequenos volumes de M199 mostraram-se mais eficientes para o isolamento de promastigotas. Entre os meios testados, bifásico BAB + Schneider, BHI e SFB apresentou o melhor desempenho, favorecendo o crescimento de promastigotas ativas, móveis e mais estáveis ao longo das semanas de incubação em todas as amostras inoculadas. No M199, o isolamento foi mais bem-sucedido em punções de baço quando comparado a punções de linfonodos. Para análise molecular, a extração automatizada demonstrou maior rendimento de DNA e taxa de positividade na PCR convencional. Assim, o

cultivo em pequenos volumes de meio líquido, associado ou não a uma fase sólida, aliado à extração automatizada e à PCR com os primers *LinR4* e *Lin19*, constitui estratégia eficiente para o isolamento e caracterização molecular de *Leishmania* sp., contribuindo para a padronização de protocolos laboratoriais e o fortalecimento da vigilância genômica em áreas endêmicas. Estudos futuros são necessários para a implementação do uso de antifúngicos no cultivo de *Leishmania*, bem como o aperfeiçoamento do protocolo para a manutenção das promastigotas *in vitro* a longo prazo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento por meio do projeto nº 2024/15388-9 do Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP). À Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) de Bauru/SP e ao Instituto Adolfo Lutz pelo apoio técnico e institucional indispensáveis para a execução desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Pitt SJ, Gunn A. The one health concept. Br J Biomed Sci. 2024;81:12366. doi: 10.3389/bjbs.2024.12366.
2. Shaheen MNF. The concept of one health applied to the problem of zoonotic diseases. Rev Med Virol. 2022;32(4):2326. doi: 10.1002/rmv.2326.
3. Ferro RS, Fonseca ES, Semensati FL, Flores ES, Giufrida R, Hiramoto RM, et al. Geospatial technologies for targeting priority areas on surveillance and response of visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil: embracing a One Health integrative approach. J Glob Health [Internet]. 2025 [citado 13 May 2026];15:04200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40708344/>
4. Brasil. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2014 [citado 10 Apr 2026]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
5. Leishmaniose viral. In: Brasil. Guia de vigilância em saúde [Internet]. 6a ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2023 [citado 10 Apr 2026]. p. 901-19. Disponível em: <https://centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude-volume-2-6a-edicao/view>
6. Tabbabi A, Mizushima D, Yamamoto DS, Katol H. Effects of host species on microbiota composition in *Phlebotomus* and *Lutzomyia* sand flies. Parasit Vectors. 2023;16:310. doi: 10.1186/s13071-023-05939-2.
7. Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral [Internet]. 2a ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2026 [citado 10 Apr 2026]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/guias-e-manuais/2026/manual-de-vigilancia-e-controle-da-leishmaniose-visceral.pdf/view>
8. Laffitte MCN, Leprohon P, Papadoupoulou B, Ouellette M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. F1000Res [Internet]. 2016 [citado 15 May 2026];5:2350. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/5-2350/v1>
9. Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis [Internet]. 2010 [citado 15

May 2026];16(3):414-20. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/XgQGYXkjKhcQwRrYdnGnVGR/?format=html&lang=en>

10. Ivanescu L, Andronic BL, Grigore-Hristodorescu S, Martinescu GV, Mindru R, Miron L. The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis: a review and assessment of recent research. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1326521. doi: 10.3389/fcimb.2023.1326521.
11. Bhattarai NR, Keshav R, Rijal S, Khanal B. In vitro assessment of antifungal caspofungin on *Leishmania donovani* culture isolation. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2017;2017(1):873187. doi: 10.1155/2017/3873187.
12. Saki J, Akhlaghi L, Maraghi S, Meamar AR, Mohebbi M, Oormazdi H, et al. Evaluation of modified Novy-MacNeal-Nicolle medium for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Iran. *Res J Parasitol [Internet]*. 2009 [citado 15 May 2026];4(2):56-62. Disponível em: <https://scialert.net/abstract/?doi=rjp.2009.28.34>
13. Siripattanapipong S, Boontanom P, Leelayoova S, Mungthin M, Tan-ariya Pa. *In vitro* growth characteristics and morphological differentiation of *Leishmania martiniquensis* promastigotes in different culture media. *Acta Trop*. 2019;197:105039. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.05.030.
14. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg [Internet]*. 2008 [citado 15 May 2026];79(6):847-52. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19052291/>
15. Sabatier M, Bal A, Destras G, Regue H, Queromes G, Cheynet V, et al. Comparison of nucleic acid extraction methods for a viral metagenomics analysis of respiratory viruses. *Microorganisms*. 2020;8(10):1539. doi: 10.3390/microorganisms8101539.
16. Prudhomme J, Delabarre A, Alten B, Berberoglu U, Berriatua E, Bongiorno G, et al. Performance evaluation of nine reference centers and comparison of DNA extraction protocols for effective surveillance of *Leishmania*-infected *Phlebotomine* sandflies: basis for technical recommendations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(12):0012543. doi: 10.1371/journal.pntd.0012543.

Recebido em: 19/05/2026

Aceito em: 07/07/2026