



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso de Biomedicina

STEPHANE NAIARA CARVALHO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SWAB ORAL E DE CONJUNTIVA OCULAR DE
ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM
ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO**

Recife
2022

STEPHANE NAIARA CARVALHO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SWAB ORAL E DE CONJUNTIVA OCULAR DE
ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM
ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO**

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

Orientador: Dr^a Maria Edileuza Felinto de Brito.

Coorientador: Dr José Ferreira Marinho Junior.

Recife
2022

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

Carvalho dos Santos, Stephane Naiara .

Aplicação de testes moleculares em amostras de swab oral e conjuntiva ocular de roedores silvestres e sinantrópicos para diagnóstico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área endêmica de Pernambuco / Stephane Naiara Carvalho dos Santos. - Recife, 2022.

49 : il., tab.

Orientador(a): Maria Edileuza Felinto de Brito

Coorientador(a): José Ferreira Marinho Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Biologia Molecular. 2. Epidemiologia. 3. Parasitologia. I. Brito, Maria Edileuza Felinto de. (Orientação). II. Marinho Júnior, José Ferreira. (Coorientação). III. Título.

500 CDD (22.ed.)

STEPHANE NAIARA CARVALHO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SWAB ORAL E DE CONJUNTIVA OCULAR DE
ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM
ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO**

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

Aprovada em: 21/11//2022

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dr^a Maria Edileuza Felinto de Brito
Instituto Aggeu Magalhães IAM/FIOCRUZ-PE/ Departamento de Imunologia

Me. Marton Kaique de Andrade Cavalcante
Universidade Federal de Pernambuco

PhD Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro
Instituto Aggeu Magalhães IAM/FIOCRUZ-PE/ Departamento de Imunologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dr^a Maria Edileuza Felinto de Brito, uma profissional com uma bagagem de conhecimento incrível, que durante esses 4 anos de graduação me acompanhou pontualmente, dando todo o auxílio necessário, conselhos, críticas, elogios, compreensão e amizade para meu desenvolvimento. Obrigada por ser uma excelente orientadora.

Aos colegas do grupo de pesquisa Dr^a Juliana Figuiêredo, Karina Patrícia por toda disponibilidade e ajuda dada durante ao desenvolvimento do trabalho. Em especial, a Samara Ferreira pelo companheirismo e amizade.

As técnicas do Serviço de Referência de Leishmaniose do IAM, Ericka Almeida e Andréa Sales por todas as dúvidas tiradas, acompanhamento e disponibilidade.

Ao acolhimento de todos os colegas do departamento de imunologia do IAM-FIOCRUZ-PE, em especial a Dr^a Valéria Pereira, Marton Cavalcanti e Allana Maria.

Ao Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ- PE por todas as estruturas disponibilizada e ao CNPq pela bolsa fornecida durante esses anos para auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos da graduação, ao meu clube das Winxs, Felix Alberto, Ana Helena, Joyce Adrielle, Ylson Santos e Vitória Maria pela amizade, conversas, risadas, estudos, frustrações e alegrias compartilhados nesses últimos anos. Pelos sacolés pós-provas.

A minha família por todo suporte e apoio fornecido para que eu tivesse o melhor para os meus estudos, em especial ao meu pai. Obrigada.

Ao meu irmão e amigo pelo apoio, amizade, conselhos, risadas e leituras dos meus textos mesmo sem entender dos assuntos da área.

A Melissa, Amora e a Lilih pela companhia de sempre durante os dias e as noites de estudos.

“Per aspera ad astra”

(Lucio Seneca)

SANTOS, Stephane Naiara Carvalho dos. **Aplicação de testes moleculares em amostras de swab oral e conjuntiva ocular de roedores silvestres e sinantrópicos para diagnóstico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área endêmica de Pernambuco**. 2022. 48. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias antropozoonóticas responsável por acometer pele, mucosas e vísceras de grande relevância para saúde pública. Na região Nordeste do Brasil, a principal espécie transmissora da Leishmaniose tegumentar é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e diversos roedores têm sido considerados hospedeiros e possíveis reservatórios naturais da mesma, sendo os principais roedores: *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*. São animais que em geral não apresentam as manifestações clínicas da doença, pois apresentam uma relação de adaptação e equilíbrio entre parasito-hospedeiro associado a adaptação do vetor fazem a manutenção do ciclo biológico do protozoário nas áreas endêmica. O diagnóstico laboratorial da doença conta com métodos de coletas invasivos e de diagnóstico pouco sensível, visto isso, a busca pela inovação através de métodos de coleta não invasiva e aplicação de técnicas de diagnóstico mais sensíveis é ascendente dentro do campo da investigação epidemiológica em áreas endêmicas. O objetivo do estudo é avaliar o desempenho da Reação em cadeia de Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) em swabs de secreção oral e de conjuntiva ocular de roedores silvestres e sinantrópicos. O estudo foi realizado no município de Amaraji, Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco, nas localidades do Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, áreas endêmicas da doença. Os roedores capturados foram devidamente identificados quanto a espécie, em seguida, anestesiados, coletadas as amostras e devolvidos a natureza. As amostras biológicas foram transportadas sob refrigeração e em seguida armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Imunoparasitologia Serviço de Referência em Leishmanioses do Departamento de Imunologia do IAM-FIOCRUZ-PE. Foram cedidas pelo Serviço de Referência em Leishmanioses 71 amostras pareadas de swab de conjuntiva ocular e secreção oral, as quais foram submetidas previamente à extração do DNA, protocolo “in house”, seguida da PCR e qPCR. Na qPCR 21,1% (15/71) de swab de conjuntiva ocular e 5,6% (4/71) de swab secreção oral tiveram o alvo kDNA da *Leishmania (Viannia) braziliensis* detectado, na PCR não houve detecção do alvo do parasito. Estatisticamente a qPCR apresentou significância ($p < 0,05$) podendo ser considerada mais sensível que a PCR Convencional principalmente ao utilizar swabs de conjuntiva ocular. Os resultados evidenciam que a qPCR assume a melhor performance frente ao uso dos swabs, em especial, casos subclínicos e de baixa carga parasitária.

Palavras-chave: PCR Convencional. qPCR. Leishmaniose Tegumentar. Animais silvestres e sinantrópicos.

SANTOS, Stephane Naiara Carvalho dos. **Application of molecular tests in oral swab samples and ocular conjunctiva of wild and synanthropic rodents for the diagnosis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in endemic area of Pernambuco.** 2022. 48.Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

The leishmaniasis are a set of infectious anthroponotic diseases responsible for affecting skin, mucous membranes and viscera of great relevance to public health. In the Northeast region of Brazil, the main circulating species is *Leishmania (Viannia) braziliensis* and several rodents have been considered hosts and possible natural reservoirs of it, the main rodents being: *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* and *Rattus rattus*. These animals generally do not show clinical manifestations of the disease, since they have an adaptive relationship and balance between parasite-host and, together with the adaptation of the vector, maintenance the biological cycle of the protozoan parasite in endemic areas. The laboratory diagnosis of the disease relies on invasive collection methods with low diagnostic sensitivity, therefore, the search for innovation through non-invasive collection and application of more sensitive diagnostic techniques is ascendant within the field of epidemiological investigation in endemic areas. The objective of the study is to evaluate the performance of Polymerase Chain Reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) in oral and conjunctival eye secretion swabs from wild and synanthropic rodents. The study was carried out in the municipality of Amaraji, South Forest Zone of the State of Pernambuco, in the localities of Engenho Raiz de Dentro and Engenho Refrigério, an endemic area for the disease. The captured rodents were duly identified as to species, then anesthetized, samples collected and returned to nature. The biological samples were transported under refrigeration and then stored in a freezer at -20°C in the Laboratory of Immunoparasitology, Reference Service in Leishmaniasis, Department of Immunology, IAM-FIOCRUZ-PE. A total of 71 paired conjunctiva swab and oral secretion samples were provided for the study, which were previously submitted to DNA extraction, "in house" protocol, followed by PCR and qPCR. In the qPCR 21.1% (15/71) of swabs of conjunctiva and 5.6% (4/71) of swabs of oral secretion had the target kDNA of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected. Statistically, the qPCR showed significance ($p < 0.05$) and can be considered more sensitive than the conventional PCR. The results show that qPCR has a better performance than swabs, especially in cases of low parasite load and subclinical cases.

Key words: Convencional PCR. qPCR. Tegumentar Leishmaniasis. Wild and synanthropic animals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Casos de LT por região no Brasil entre 2011 e 2020	13
Figura 2 – Roedor Silvestre <i>Necromys lasiurus</i>	15
Figura 3 – Roedor Silvestre <i>Nectomys squamipes</i>	15
Figura 4 – Roedor Sinantrópico <i>Rattus rattus</i>	15
Figura 5 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	16
Figura 6 – Domicílio no Engenho Raiz de Dentro	25
Figura 7 – Domicílio no Engenho Refrigério	25
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando apenas as bandas dos controles positivos utilizados de 1ng e 10pg.	29
Figura 9 – Eficiência da curva de diluição padrão	30
Figura 10 – Amplificação da curva padrão <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	30
Figura 11 – Amplificação das amostras de DNA de swabs de roedores positivas	31
Figura 12 – Curva de <i>Melt</i> da qPCR de amostras de swabs de roedores	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de DNA nas amostras positivas de <i>swabs</i> de secreção oral	31
Tabela 2 – Quantidade de DNA das amostras positivas <i>swabs</i> de conjuntiva	32
Tabela 3 – Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares nas amostras de <i>swabs</i>	32
Tabela 4 – Desempenho dos <i>swabs</i> na qPCR	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CT	<i>Cycle threshold</i>
ELISA	<i>Linked Immunosorbent Assay</i>
HRM	<i>High resolution melting</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Difusa
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PM	Peso Molecular
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
SRL	Serviço de Referência em Leishmaniose
SBF	Soro Bovino Fetal
TAE	Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

- 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**
 - 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
 - 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO
 - 1.3 HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS E VERTEBRADOS
 - 1.4 CICLO BIOLÓGICO
 - 1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LT
 - 1.6 DIAGNÓSTICO DA LT
 - 1.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
 - 1.6.2 PCR em Tempo Real (qPCR)
 - 1.7 MÉTODOS DE COLETA

- 2 OBJETIVOS**
 - 2.1 OBJETIVO GERAL
 - 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3 METODOLOGIA**
 - 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS
 - 3.2 ÁREA DE ESTUDO
 - 3.3 PONTOS DE CAPTURAS
 - 3.4 CAPTURAS DE ANIMAIS
 - 3.5 AMOSTRAS
 - 3.6 CULTIVO DE CÉLULAS
 - 3.7 CURVA DE DILUIÇÃO
 - 3.8 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA
 - 3.9 REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE (PCR)
 - 3.10 PCR EM TEMPO REAL (QPCR)
 - 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

- 4 RESULTADOS**
 - 4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CONVENCIONAL)
 - 4.2 PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

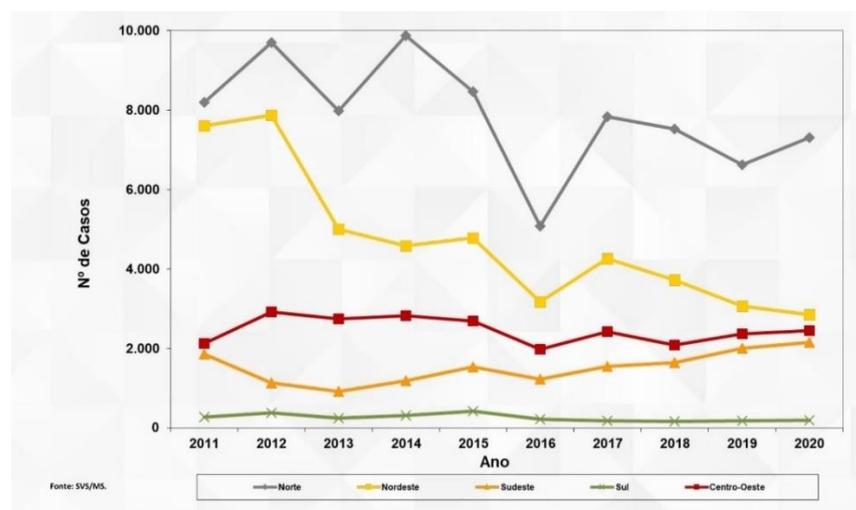
As leishmanioses são um grupo de doença parasitária causada por protozoário, caracterizada por seu amplo espectro clínico. A literatura descreve relatos da enfermidade desde a Antiguidade, no primeiro século d.C na Ásia Central (LAINSON; SHAW 1987;). As primeiras descrições clínicas foram feitas por Oviedo e por Pizarro no século XVI, os quais se referiam a uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais. A leishmaniose tegumentar ficou conhecida pelos viajantes por botão-do-oriental, no Brasil, em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste Brasil na cidade de Bauru no estado de São Paulo, houve inúmeros casos de lesões de pele similares ao botão-do-oriental, onde gerou a denominação de úlcera de Bauru. Em 1911, Gaspar Vianna, nominou os parasitos causadores da úlcera de Bauru como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES *et al* 2016).

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas de grande relevância para saúde pública devido à distribuição de casos em todo o mundo. A falta de discussões e de políticas aplicadas à doença tem como consequência uma complexidade eco-epidemiológica que dificulta a notificação de casos, diagnóstico e tratamento. A leishmaniose tegumentar (LT) é distribuída em 88 países, nos quatro continentes, Américas, Europa, África e Ásia, com registro anual de 0,9 a 1,5 milhão de casos novos e cerca de 350 milhões de pessoas habitando áreas risco de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2021).

Nas Américas, a LT é endêmica em 18 países com distribuição desde Argentina até o México, com registro anual de aproximadamente de 46.000 casos com distintas manifestações clínicas (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2021). Dentre estes, o Brasil ganha destaque com registros médios de 26.000 casos por ano, sendo a região Norte e Nordeste as mais afetadas do país (Figura 1). No Nordeste, os estados do Ceará, Maranhão e Pernambuco representam a maior parte dos casos da região (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.* 2017; BRITO *et al.*, 2012). A presença de resquícios de Mata Atlântica no Nordeste favorece a colonização dos flebotomíneos, mamíferos sinantrópicos e silvestres, o que propicia a alta incidência de casos na região. (BRANDÃO-FILHO *et al.*,2003).

A principal espécie circulante no Nordeste e no estado de Pernambuco é a *L. braziliensis*, responsável pela manutenção do ciclo de transmissão nas áreas endêmicas da doença (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2009). Em Pernambuco, 60% dos casos são da Zona da Mata, que afeta toda população independente de sexo e de faixa etária, principalmente homens que desenvolvem atividades laborais e sociais em torno da mata, aumentando a exposição ao vetor (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2001, 2003).

Figura 1 – Casos de LT por região no Brasil entre 2011 e 2020



Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde e Ministério da Saúde, 2021.

No Brasil, em 2003, foi confirmada autoctonia de casos em todos os estados do país. A LT apesar de uma zoonose silvestre, apresenta padrões em áreas rurais e periurbanas devido ao avanço do desmatamento e atividades que são desenvolvidas em torno dessas áreas degradadas. Dessa forma, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2017), a doença apresenta três padrões epidemiológicos: Silvestre, com transmissão em área de vegetação primária e é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, embora possa acometer o ser humano quando ele entra em contato com o ambiente silvestre; ocupacional e lazer, onde a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e à derrubada de matas para construções; Rural e periurbano em áreas de colonização, que está relacionado ao processo migratório, à ocupação de encostas e aos aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais.

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Atualmente, são reconhecidas 12 espécies de *Leishmania* de interesse médico para humanos com tropismo pela pele e mucosa. Entretanto, no Brasil, são predominantes sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, são elas: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (L.) amazonenses* (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.* 2017).

Dentre as sete espécies circulantes no país, a *L. (V.) braziliensis* foi a primeira espécie descrita e incriminada como agente etiológico da LT no Brasil. Ela é a principal agente da doença em Pernambuco e em outros estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.* 2017; BRITO *et al.*, 2008; 2009, 2012, 2018; 2022). A ecoepidemiologia da LT associada à *L. (V.) braziliensis* assume características distintas nos diferentes biomas do país e apresenta uma ampla distribuição no Brasil e no mundo desde à América Central até a Argentina (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.* 2017).

A forma clínica das lesões de pele causada por essa espécie é em geral lesão única ulcerada no local da inoculação do parasito pelo vetor ou múltiplas em casos de disseminação por via hematogênica ou várias picadas do flebotomíneo. Além disso, a referida espécie apresenta baixa carga parasitária na lesão (BRITO *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017)

1.3 HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS E VERTEBRADOS

Os hospedeiros invertebrados são insetos da Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*. São denominados de flebotomíneos, mas a depender da região são popularmente conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, birigui (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017).

Os flebotomíneos são definidos com inseto-vetor das leishmanioses, no Brasil, apesar da fauna ser diversificada segundo Galati (2003), as principais espécies envolvidas na transmissão dos agentes da leishmaniose tegumentar são *L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. Esses vetores possuem uma relação íntima com algumas espécies de *Leishmania* e reservatórios, sendo específicos de determinados agentes etiológicos de algumas das formas clínicas das leishmanioses nas diferentes regiões do país. Em Pernambuco, o

principal vetor da *Leishmania braziliensis* é o *L. whitmani* (DANTAS- TORRES *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017)

Os hospedeiros vertebrados são representados por várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). A variedade de hospedeiros vertebrados que epidemiologicamente se comportam como reservatório contribui para a dispersão da doença, constituindo uma dinâmica reservatório-parasito multifatorial e imprevisível formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES-Torres *et al.*, 2007 e SILVA *et al.*, 2022). Alguns roedores silvestres e sinantrópicos são descritos como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais, sendo as principais espécies: *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus* (Figura 2, 3 e 4) (BRANDÃO-FILHO *et al.* 2003; 2003a). Existem registros de infecção em animais domésticos, esses são considerados hospedeiros acidentais assim como humano por não haver comprovação científica de que fazem o papel de reservatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2022).

Figura 2 – Roedor Silvestre *Necromys lasiurus*



Figura 3 – Roedor Silvestre *Nectomys squamipes*



Fonte: BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; MARINHO-JÚNIOR, 2010.

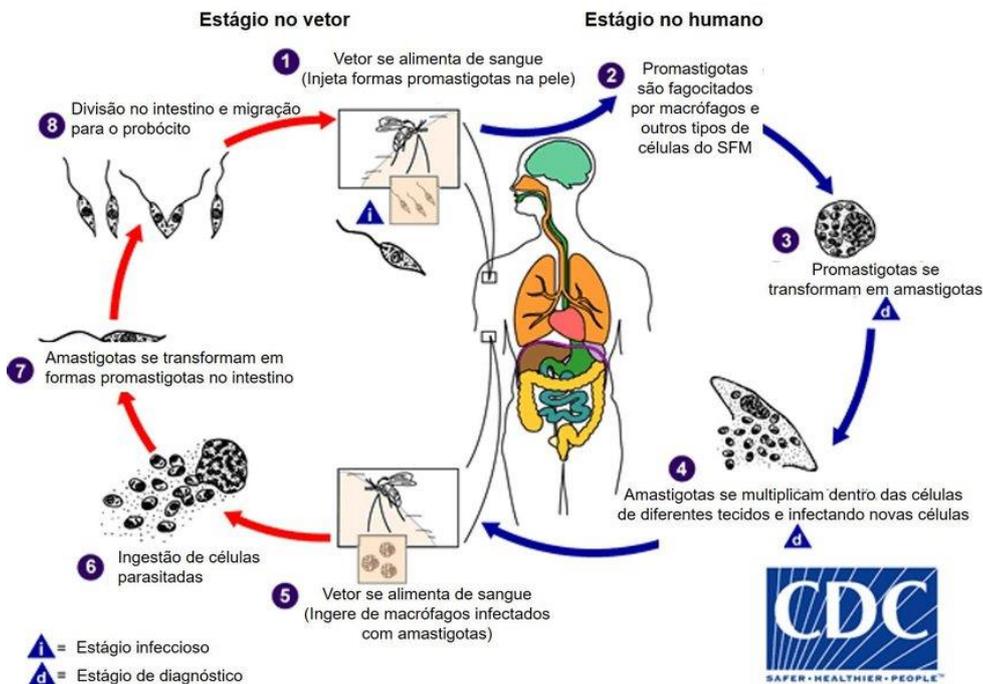
Figura 4 – Roedor Sinantrópico *Rattus rattus*



1.4 CICLO BIOLÓGICO

Os protozoários do gênero *Leishmania* tem ciclo de vida heteroxênico, sendo necessário a presença de um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado para completar seu desenvolvimento. Esses parasitas possuem duas formas evolutivas: a primeira é extracelular e flagelada, denominada de promastigota, a segunda é intracelular obrigatória e aflagelada chamada de amastigota. Quando o inseto vetor, previamente infectado com o protozoário, faz repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado inoculam as formas promastigotas metacíclicas, quando encontram-se livres no meio intersticial são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, que não conseguem destruí-las, visto que o parasito trocou de forma evolutiva, a forma amastigota, onde irão se reproduzir por divisão binária dentro dos macrófagos da pele ou das vísceras. Por sua vez, quando o vetor faz o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado parasitado, esses ingerem a forma amastigotas que evoluem no interior do tubo digestivo tornam-se alongadas e com flagelos assumindo a forma promastigotas e retornando ao ciclo biológico (REY, 2010; NEVES *et al*, 2016).

Figura 5 – Ciclo biológico da *Leishmania*



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention – CDC Modificado, 2017.

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LT

A LT exibe um espectro clínico diverso, o qual vai depender de fatores relacionados a espécie de parasito, vetor, reservatório, estado nutricional e imunológico do hospedeiro acidental. A doença possui quatro perfis clínicos, são eles: leishmaniose localizada, difusa, disseminada e mucosa. O perfil clínico apresentado somado aos fatores citados irá premeditar a gravidade de sinais e sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017).

Leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma clínica mais comum. A lesão surge no local da picada do vetor, sendo o período de incubação do parasito de semanas a meses (BURZA *et al.*, 2018). Inicialmente, ocorre um aumento da temperatura local e inchaço, acompanhado de uma mácula que perdura por 2 dias após da picada. Progressivamente a lesão aumenta de tamanho evoluindo para uma pápula, posteriormente um nódulo que irá ulcerar lentamente nos meses seguintes. A úlcera costuma ser indolor, arredondada, base eritematosa, infiltrada, apresenta bordas delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017; BURZA *et al.*, 2018). Presença de bactérias no local pode gerar dor e produção de exsudato que recobre a ferida, dificultando o diagnóstico e a resolução da lesão pode ser espontânea dentre 6 a 15 meses, entretanto, se não tratada corretamente a úlcera pode durar de 3 meses a 20 anos e ocorrer a metástase do parasito para mucosas (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017).

A forma menos comum é a leishmaniose difusa (LD), é um perfil clínico raro e grave caracterizado pela falta de resposta imune celular aos antígenos do parasito, chamado de anergia. A lesão inicial consiste em nódulo eritematoso e placas infiltradas não ulceradas, com resposta imune celular deficiente, facilitando a disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática fazendo com que outras lesões apareçam ao longo do corpo. Devido anergia, a resposta terapêutica é baixa, sem cura espontânea e de difícil tratamento. Outra forma é a recidiva cútis caracterizada pela reativação nas bordas da lesão cicatrizada ou aparecimento de lesões satélites próximo a cicatriz da lesão primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; BURZA *et al.*, 2018).

Dentre essas formas, ainda existe a leishmaniose cutânea disseminada (LCD), na qual as lesões são múltiplas do tipo erupções acneiformes, pápulas inflamatórias,

nódulos e úlceras. Geralmente as lesões são de pelo menos 10 ou mais em dois segmentos corporais ou em todo corpo, além da invasão de mucosas devido a disseminação por via hematogênica ou linfática. O comprometimento das mucosas nessa forma LCD é frequente, com preferência pela mucosa nasal atingindo o septo nasal com a presença de inflamação superficial sem ulceração (MACHADO *et al.*, 2019).

A leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada pelo aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do sistema respiratório superior, sendo considerada uma forma secundária à lesão cutânea tratada ou tratada de maneira inadequada. Fatores relacionados ao parasita, hospedeiro e a resposta imune são relevantes para o dano da mucosa. Os sintomas relacionados a LM são: rinorreia, obstrução nasal, hiperemia, presença de nódulo eritematosos, edema nasal. Apesar do comprometimento do septo nasal ser o mais frequente, pode afetar ainda a mucosa oral como o palato, gengiva, laringe causando deformidades e morbidades (ITO *et al.*, 2015).

1.6 DIAGNÓSTICO DA LT

O diagnóstico da LT, devido ao amplo espectro clínico, deve ser baseado nos dados epidemiológicos, associados as manifestações clínicas com anamnese das lesões, sinais e sintomas e dos testes laboratoriais.

Na rotina, os testes parasitológicos são os mais utilizados, sendo o mais comum o exame direto, com a visualização da forma evolutiva amastigota corados com Giemsa, Wright, Leishman ou Feulgen microscópio, apesar de ser um teste acessível e simples, exige do profissional boa experiência e apresenta baixa sensibilidade com o passar do tempo de evolução da lesão (ANDRADE *et al.*, 2008)

Outro teste parasitológico é o isolamento do agente etiológico por cultura, permite a identificação da espécie, sendo o meio de cultura mais utilizado o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN. O Parasito cresce bem em temperatura ambiente (24° a 26°C). O isolamento também pode ser realizado *in vivo*, a partir da inoculação do material em Hamsters *Mesocricetus auratus* que devem ser acompanhados de três a seis meses. Embora sejam métodos mais sensíveis dentre os parasitológicos, são menos usados na rotina devido ao alto custo, maior espera por resultados. Além disso o método de coleta para esses tipos de exames são desconfortáveis constituindo-se em escarificação da borda da lesão, biópsia com

impressão do fragmento cutâneo em lâmina e punção aspirativa (WILSON, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.* 2017; ARONSON *et al.*, 2019).

Testes imunológicos também são usados como diagnóstico, técnicas como a ELISA (*Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta (IFI) e Western blot, no entanto, possuem limitações devido as reações cruzadas com agentes de outras doenças como chagas, diminuindo a sua especificidade (BRITO *et al.*, 2001). Em lesões recentes de um a seis meses de evolução, a negatividade sorológica é frequente e não permite a diferenciação entre uma infecção atual e passada, não sendo viável para acurácia em imunossuprimidos (GONTIJO *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2008).

A utilização de testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico na LT têm assumido uma grande importância nos laboratórios de referências por serem testes mais sensíveis, rápidos, que permitem a identificação e quantificação dos parasitas em diversos tipos de amostras e em casos subclínicos de baixa carga parasitária (ARONSON *et al.*, 2019).

1.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR descoberta nos anos 80 por Kary Mullis e colaboradores, os quais desenvolveram um processo pelo qual o DNA poderia ser amplificado exponencialmente, através de ciclos repetidos de duplicação tendo a DNA Polimerase como enzima catalizadora da reação. A utilização de reagentes como água destilada MgCl₂⁺, dNTPs, oligonucleotídeos, solução tampão e DNA polimerase para técnica é essencial para que ocorra a amplificação da sequência de ácidos nucleicos de interesse através dos processos cíclicos compostos por variações de temperatura que incluem a desnaturação do DNA, anelamento dos oligonucleotídeos, extensão da fita de DNA e amplificação (NOVAIS *et al.* 2004; ZHU *et al.*, 2020).

A PCR se tornou uma das técnicas moleculares mais utilizadas na área das biociências, diagnóstico e genética forense (ZHU *et al.*, 2020). Com o advento da técnica, as pesquisas de doenças genéticas, polimorfismos, detecção de agentes infecciosos, clonagem de DNA para expressão de gene ou proteína e análises de DNA na medicina forense tomaram outras perspectivas por ser um método mais específico, capaz de detectar as regiões polimórficas do DNA alvo através do uso *primers* (NOVAIS *et al.* 2004; ZHU *et al.*, 2020).

Com o avanço e aprimoramento da metodologia, atualmente a PCR é amplamente utilizada para o diagnóstico da LT em virtude da sua alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade quando comparada aos métodos tradicionais como o exame direto e cultura (SATOW *et al.*, 2013). A especificidade e sensibilidade pode variar de acordo com o alvo, sendo o DNA do cinetoplasto (kDNA) um dos alvos mais utilizados para o diagnóstico da leishmaniose e identificação de espécies. O cinetoplasto, uma organela exclusiva dos cinetoplastídeos, que contém cerca de 10.000 pequenos DNAs circulares, conhecidos como minicírculos, que estão entre 600 e 800 pb em membros do gênero *Leishmania*, esse alvo tem uma sensibilidade que varia de 75% a 98% (RODRIGUES *et al.*, 2002; SATOW *et al.*, 2013).

Para os subgêneros circulantes no Brasil, o alvo kDNA apresenta uma sensibilidade 95,5% para o subgênero *Viannia* e 88,2% para o subgênero *Leishmania*, se tornando uma ferramenta bastante utilizada para LT tanto em Pernambuco como em outros estados endêmicos (RODRIGUES *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2012; SATOW *et al.*, 2013). A técnica da PCR, com o aperfeiçoamento sofreu variações dando origem a RT-PCR, PCR quantitativa em tempo real (qPCR), PCR LAMP e entre outras (ZHU *et al.*, 2020).

1.6.2 PCR em Tempo Real (qPCR)

A qPCR é uma das variações da PCR convencional, que revolucionou o processo de identificação e quantificação dos fragmentos de DNA e RNA com mais precisão e reprodutibilidade por ser rápida, ter ampla faixa dinâmica e risco contaminação cruzada reduzido pelo fato de não precisar abrir os tubos com os produtos amplificados para pós-análises como a etapa de visualização em gel de agarose necessária na PCR convencional (NOVAIS *et al.*, 2004; GALLUZZI *et al.*, 2018).

O princípio da técnica é baseado na emissão de sinais fluorescentes emitidos pelos fluoróforos durante o processo de amplificação que ocorre semelhante a PCR convencional, com fases de desnaturação, anelamento e extensão submetidas a variadas temperaturas durante os ciclos. Os valores de fluorescência são gravados a cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado e estes valores podem ser monitorados em tempo real durante toda a reação. Os fluoróforos mais utilizados são Syber Green e TaqMan. O sistema Syber Green é um corante não

específico que liga a toda dupla fita de DNA amplificada, já o sistema TaqMan é uma sonda utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados ao qual ocorre emissão de luz quando há sua degradação na reação (NOVAIS *et al.*, 2004; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010).

A qPCR necessita de um termociclador com um sistema ótico para detectar a fluorescência e de um computador com o Software para gerar os dados e gráficos a fim de permitir a análise final. Na reação, existe um limiar chamado de *Cycle threshold* (Ct), considerado ponte de corte entre as amostras positivas e negativas, sendo o ponto que permite a quantificação exata da fluorescência. (NOVAIS *et al.*, 2004). No sistema Syber Green, existe um parâmetro chamado curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*) a ser analisado, o qual garante mais especificidade à reação e melhora a análise dos resultados. A curva de *melting* corresponde a temperatura em que 50% do DNA está desnaturado, ou seja, quando as fitas estão dissociadas. A análise desse parâmetro ajuda a verificar se houve a formação produtos inespecíficos, dímeros de oligonucleotídeos ou do produto alvo (GALLUZZI *et al.*, 2018; NOVAIS *et al.*, 2004).

Assim como a PCR convencional, a qPCR possuem inúmeras aplicações na área das biociências e medicina, seu grande potencial é por ser uma técnica qualitativa e quantitativa que permite um melhor controle do processo durante sua execução, além de ser mais rápida, ter alta sensibilidade e acurácia com chances reduzidas de contaminação (NOVAIS *et al.*, 2004).

O uso desse método aplicado ao diagnóstico na LT, monitoramento epidemiológico de vetores e reservatórios e identificação de espécies em áreas endêmicas têm contribuído para o aprimoramento de protocolos garantindo uma técnica cada vez mais precisa e rápida, permitindo a utilização de variados tipos de amostras como biópsia, sangue, *swab* e saliva (GOMES *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2018; GALLUZZI *et al.*, 2018).

1.7 MÉTODOS DE COLETA

O método de coleta muitas vezes pode interferir no sucesso do teste aplicado e na LT a amostragem é diversa, devido as formas clínicas, sendo por vezes métodos dolorosos e invasivos envolvendo geralmente tipos de amostras como: biópsia da lesão, punção aspirativa, escarificação e sangue periférico para diagnóstico de forma

direta ou indireta do parasito. O sangue periférico pode ser utilizado na sorologia e testes moleculares.

A biopsia é realizada a partir da borda da lesão previamente limpa e anestesiada com o auxílio de um bisturi ou *punch* e a amostra pode ser utilizada para cortes histológicos, lâminas e em meios de cultura. Na punção aspirativa é realizada uma lavagem com solução salina na lesão ou em um linfonodo. A escarificação consiste no raspado da borda interna ou da superfície de lesão fechada, o qual é espalhado sob uma lâmina com o auxílio de um bisturi (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; GALLUZZI *et al.*, 2018). A aplicabilidade de métodos de coleta não invasivo destaca-se também no diagnóstico na LT ao garantir maior conforto na coleta de material por *swab* aplicado a diferentes substratos como lesão, saliva e conjuntiva ocular (CORVALAN *et al.*, 2011)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de testes moleculares em amostras de *swab* oral e da conjuntiva ocular de roedores silvestres e sinantrópicos, potenciais reservatórios da *L. (V.) braziliensis*, em área endêmica de Pernambuco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o desempenho dos testes moleculares de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) nas amostras de *swab* oral e de conjuntiva ocular de roedores silvestres e sinantrópicos.

b) Comparar em proporções o desempenho das técnicas de PCR (convencional e quantitativa) nas amostras de *swab* oral e de conjuntiva ocular dos roedores.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho faz parte de um projeto maior “Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*.” e tem aprovação e Certificado da Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ – PE (CEUA /IAM- FIOCRUZ-PE), sob n° 017/2011 e autorização para atividades com finalidade científica emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), n° 127.

3.2 ÁREA DE ESTUDO

O trabalho de campo foi desenvolvido nas localidades do Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, (ambas as regiões são endêmicas para a doença), município de Amaraji, localizado na Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco, a cerca de 100 Km do Recife, entre 8° 23' S, 35° 27'W, a 385m acima do nível do mar, com índice pluviométrico médio anual superior a 1.000mm. A população total está estimada em cerca de 22.600 habitantes, onde aproximadamente 70% residem em área urbana e os demais na zona rural, onde predomina a monocultura de cana-de-açúcar.

3.3 PONTOS DE CAPTURAS

Nas localidades estudadas, Engenho Raiz de Dentro e Refrigério (Figura 6 e 7) foram determinados 15 pontos de capturas de roedores silvestres e sinantrópicos, sendo dez na localidade do Engenho Raiz de Dentro, e, cinco no Engenho Refrigério. As armadilhas tipo Tomahawk (dimensões 45cm x 21cm x 21cm) utilizadas para captura de roedores silvestres e sinantrópicos foram instaladas nos pontos pré-determinados onde permaneceram por 12 horas.

Figura 6 - Domicílio no Engenho Raiz de Dentro



Fonte: MARINHO-JÚNIOR, J.F. 2015.

Figura 7 - Domicílio no Engenho Refrigério



Fonte: MARINHO-JÚNIOR, J.F. 2015.

3.4 CAPTURAS DE ANIMAIS

Os animais capturados foram devidamente identificados quanto a espécie, sendo as principais espécies encontradas: *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus*, *Rattus rattus*, *Oxymycterus angulares*, *Holochilus scenes* e *Akodon arviculoide*. Em seguida, anestesiados seguindo protocolo com pré-anestésico Xilazina 2%,

anestésico Cetamina 10%, e coletadas amostras de sangue total entre 0,5 e 1 mL, por pipetas Pasteur por via retroorbital. Em seguida, foram coletados *swab* oral e conjuntiva do animal. Após a coleta das amostras os animais foram colocados em microisoladores para recuperação do procedimento anestésico e, posterior devolução ao ponto de captura no dia seguinte.

3.5 AMOSTRAS

Amostras obtidas no projeto maior, por *swab* salivar e conjuntiva ocular coletadas dos roedores silvestres e sinantrópicos foram dispensadas separadamente em coletores de 80 ml estéril, as amostras biológicas foram transportadas sob refrigeração e em seguida armazenadas em freezer a -20° no Laboratório de Imunoparasitologia, Serviço de Referência em Leishmanioses do Departamento de Imunologia do IAM-FIOCRUZ-PE.

3.6 CULTIVO DE CÉLULAS

Formas promastigotas da cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903) da *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram cedidos pelo Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) e mantidos em meio de cultura de Schneider's, pH 7,2, suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de solução de penicilina-estreptomicina e acondicionada em estufa incubadora a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e foram expandidas e utilizadas nas diferentes técnicas moleculares.

3.7 CURVA DE DILUIÇÃO

Foi feita preparação da curva de DNA com o pellet de cultura de promastigotas da cepa de referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas concentrações de DNA: 10ng/ μL , 1ng/ μL , 100pg/ μL , 10pg/ μL , 1pg/ μL , 100fg/ μL , 10fg/ μL e 1fg/ μL .

3.8 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

As extrações de DNA dos *swabs* foram realizadas com o Kit “in house” de acordo com o protocolo padronizado por Silva *et al*, (2017). Após a extração, cada amostra purificada foi utilizada para a quantificação do DNA genômico no Nanodrop 2000 Thermo Scientific®, para avaliação do grau de pureza e concentração adequada aos testes moleculares.

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CONVENCIONAL)

O DNA das amostras de *swabs* foram analisadas pela PCR convencional consiste na mistura de volume final de 25µl contendo Tris - HCl (10 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,2mM), 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (LEIB1 e LEIB2) e 2,5µL da enzima Taq DNA Polimerase, a essa mistura é adicionada 2 µL amostra de DNA de cada roedor conforme descrito por De Bruijn e Barker (1992) A PCR foi realizada em 35 ciclos (94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 1 min) (ERESH, MCALLUM; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Os iniciadores LEIB1 5'-GGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3' e LEIB2 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG - 3' amplificam até 750pb do alvo kDNA da *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Um controle negativo (sem DNA) foi adicionado a cada preparação de uma reação juntamente com um controle positivo procedentes da cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, na concentração de 1ng e 10pg do DNA genômico, tendo um limite de detecção de DNA de 10pg.

Foram utilizados dez microlitros (10µl) dos produtos da PCR para análise na eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM) corados por solução de brometo de etídio 0,05g/mL (RODRIGUES *et al.*, 2002; SAMBROOK *et al.*, 2001). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com o sistema Kodak®, modelo *Gel Logic 100 Imagem System*.

3.10 PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

As amostras de DNA de *swabs* extraídas, foram submetidas também a qPCR, tendo como alvo o kDNA da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, amplificando um fragmento de até 138pb, foi utilizado o termociclador modelo/ano 7500/2011 Applied Biosystems®, os resultados analisados através do Software 7500 version 2.0.5 (Applied Biosystems®). A reação teve um volume final de 25µl, contendo 12,5µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), 0,5µL de cada primer (kDNAf1 5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3'e kDNAr1 5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT'-3') na concentração de 5pmol/µL, 9,5µL de H2O Milliq e 2µL do DNA da amostra. As amostras foram testadas em duplicatas em uma reação de amplificação de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15s e anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 min. A temperatura de *melting* para esse sistema varia de 78° a 81°C e a técnica tem limite de detecção de 1fg. As reações e seus resultados foram analisados conforme as descrições de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2013.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da sensibilidade, especificidade e acurácia foram realizadas pelo programa estatístico Open Epi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health) v.3.01. O programa estatístico IBM SPSS (Statistics Base) v. 20.0 foi utilizado para a construção do banco de dados. A comparação em proporções das técnicas será realizada pelo MedCalc Software Ltda 2022 Versão 20.114. Para obtenção dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos comparamos os resultados, obtidos no do projeto maior, da qPCR de sangue dos roedores.

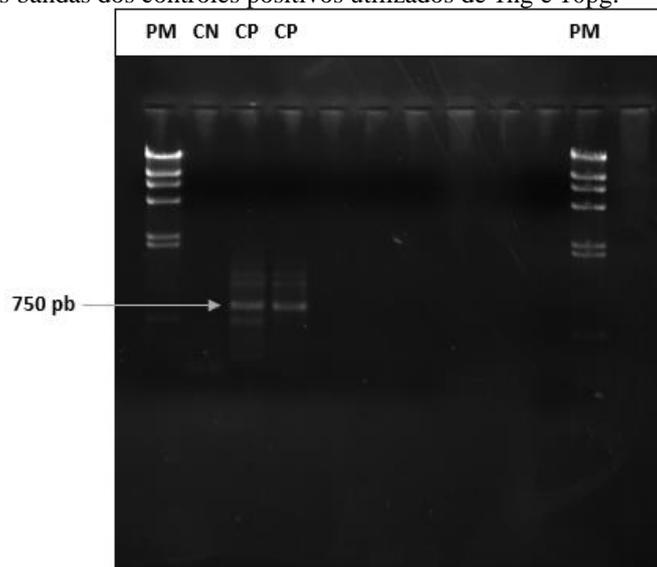
4 RESULTADOS

Foi utilizado um total de 142 amostras pareadas de *swabs*, sendo 71 de *swabs* de conjuntiva ocular e 71 *swabs* de secreção oral de roedores silvestres e sinantrópicos.

4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CONVENCIONAL)

Os resultados foram negativos para *Leishmania (Viannia) spp.* em todas as amostras de *swabs*. Os produtos da reação foram revelados por meio da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando apenas as bandas dos controles positivos utilizados de 1ng e 10pg.



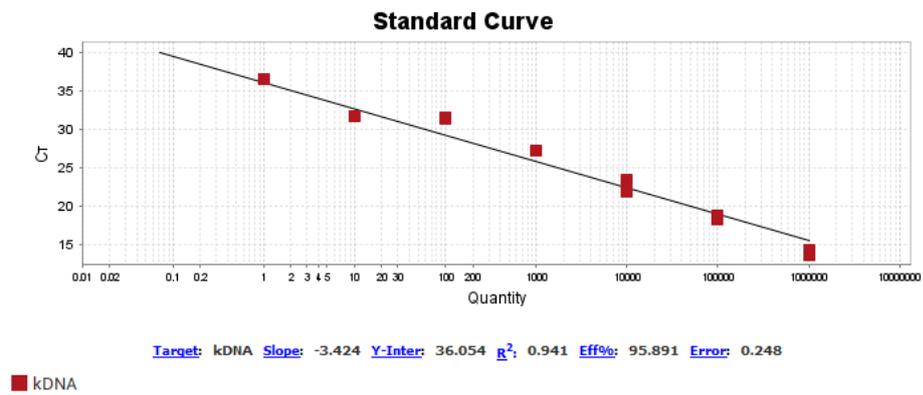
Legenda: PM (Marcador de peso molecular DNA); CN (Controle Negativo); CP (Controle positivo)

Fonte: A autora, 2022

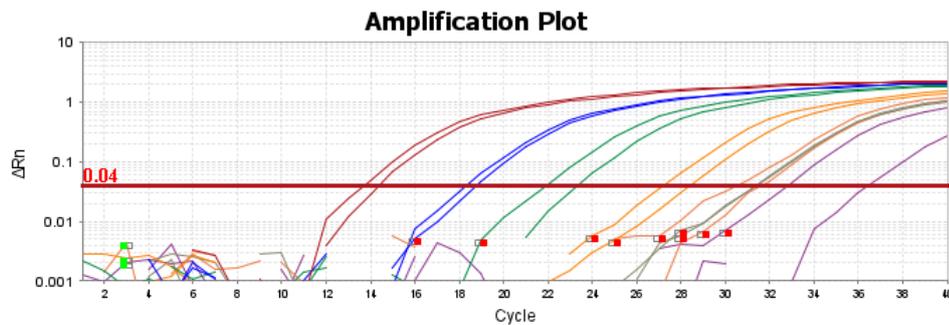
4.2 PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

A amplificação da curva de diluição padrão obteve um resultado de eficiência de 95.891% como demonstram as figuras 9 e 10.

Figura 9 – Eficiência da curva de diluição padrão

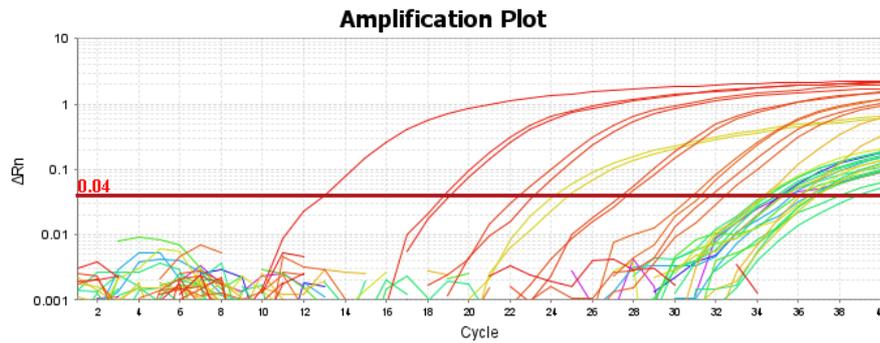


Fonte: A autora, 2022.

Figura 10 – Amplificação da curva padrão *Leishmania (V.) braziliensis*.

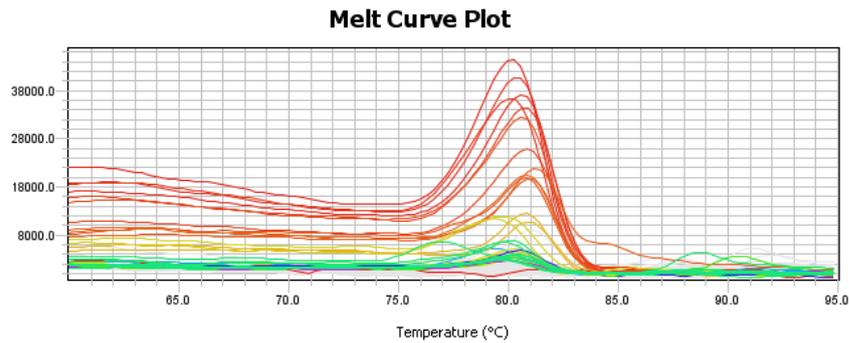
Fonte: A autora, 2022

Dentre as 142 amostras, 13,3% (19/142) foram positivas para *L. (V.) braziliensis* na qPCR. Quando comparada a positividade das amostras pareadas 21,1% (15/71) de *swab* de conjuntiva ocular e 5,6% (4/71) de *swab* secreção oral tiveram o alvo kDNA detectados pela técnica, baseada na análise *Curve Melt* (Figura 11 e 12). Ainda, as amostras detectadas foram quantificadas na reação de qPCR na unidade de fentogramas (fg) (Tabela 1 e 2). A qPCR de sangue obteve 19,7% (14/71) das amostras positivas.

Figura 11 – Amplificação das amostras de DNA de *swabs* de roedores positivos

Legenda: Vermelho (**Curva padrão**); Amarelo, Verde e Azul (**Swabs de roedores positivos**).

Fonte: A autora, 2022.

Figura 12 – Curva de Melt da qPCR de amostras de *swabs* de roedores

Legenda: Vermelho (**Curva padrão**); Amarelo, Verde e Azul (**Swabs de roedores positivos**)

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 1 – Quantidade de DNA nas amostras positivas de *swabs* de secreção oral

Swabs de secreção oral		
Roedores	Resultado	Quantidade (fg)
Roedor 21	Positivo	2,25
Roedor 25	Positivo	54,23
Roedor 28	Positivo	2,33
Roedor 34	Positivo	1,70

Fonte: A autora, 2022

Tabela 2 – Quantidade de DNA das amostras positivas *swabs* de conjuntiva

Swabs de conjuntiva		
Roedores	Resultado	Quantidade (fg)
Roedor 17	Positivo	10,883
Roedor 19	Positivo	17,219
Roedor 20	Positivo	12,093
Roedor 21	Positivo	1,34
Roedor 22	Positivo	2,88
Roedor 24	Positivo	2,34
Roedor 29	Positivo	1,01
Roedor 32	Positivo	1,57
Roedor 33	Positivo	2,84
Roedor 34	Positivo	1,32
Roedor 35	Positivo	2,35
Roedor 42	Positivo	1,95
Roedor 47	Positivo	1,40
Roedor 57	Positivo	1,10
Roedor 96	Positivo	27,0

Fonte: A autora, 2022.

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Calculou-se a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares nos swabs oral de conjuntiva ocular com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (Tabela 3), utilizando a qPCR do sangue de roedores como referência.

Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares nas amostras de *swabs*

	PCR Convencional	PCR em tempo real
Sensibilidade	0.0% (0.0, 21.5)	57.58%(40.8, 72.7)
Especificidade	44.53% (36.2, 53.1)	52.29%(43.0, 61.3)
Acurácia	40.14%(32.4, 48.3)	53.52%(45.3, 61.5)

Fonte: A autora, 2022

Estatisticamente a qPCR apresentou significância com o valor de $p < 0,001$ quando comparada à PCR Convencional, indicando maior sensibilidade em detectar o alvo kDNA em amostras de *swabs* de roedores. O uso do *swab* de conjuntiva ocular obteve melhor desempenho na qPCR em relação *swab* oral (Tabela 4)

Tabela 4 - Desempenho dos *swabs* na qPCR

	Swab de Conjuntiva ocular	Swab Oral
Sensibilidade	51,72% (34.4, 68.6)	22,22% (9.001,45.2)
Especificidade	50,44% (40.9, 59.0)	45,97% (37.4,54.7)
Acurácia	50.35% (42.25, 58.4)	42.96% (35.1, 51.1)

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico da LT é bastante criterioso, sendo necessário uma avaliação epidemiológica, clínica e laboratorial. Para avaliação laboratorial, por vez, são utilizadas coletas invasivas e dolorosas como biópsia e punção, e essas amostras são aplicadas aos exames clássicos parasitológicos, os quais tem uma baixa sensibilidade e requer profissional extremamente capacitado ser o responsável pelo laudo diagnóstico (ARONSON *et al.*, 2019).

Diante disso, surge a necessidade de técnicas de amostragem menos invasivas e práticas, assim como técnicas de diagnóstico mais precisas principalmente em áreas endêmicas que requer estudos epidemiológicos e diagnóstico desde vetor até o hospedeiro acidental. Além da detecção da circulação de roedores silvestres e sinantrópicos nessas áreas, intitulados como reservatórios naturais da *Leishmania* spp., estes não apresentam sinais clínicos evidentes, tidos como assintomáticos, mas em cooperação com o vetor permitem a manutenção do ciclo biológico do protozoário (MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2017; BRANDRÃO-FILHO *et al.*, 2003a; 2003b).

A associação de um método de amostragem menos invasiva com técnicas moleculares é ascendente no diagnóstico da LT em virtude da praticidade de coleta, manejo e transporte, somado a rapidez e precisão das técnicas moleculares (GOMES *et al.*, 2017; DAOUI *et al.*, 2020). No presente estudo, foram utilizados *swabs* de conjuntiva ocular e de secreção oral de roedores silvestres e sinantrópicos, potenciais reservatórios, circulantes de área endêmica para doença, Amaraji-PE, uma vez que é possível a disseminação do parasito por via hematogênica e linfática, o que permite a detecção do parasito nesses sítios, embora até então esses aspectos não tenham sido bem discutidos (FIGUEROA *et al.* 2009; LOMBARDO *et al.*, 2012 BRITO *et al.*, 2018).

O sistema de PCR Convencional utilizado é específico para o subgênero *Viannia* e amplifica um produto de 750pb, com limite de detecção até 10pg, baseado em Bruijn e Barker (1992). Tendo como alvo molecular os minicírculos do genoma mitocondrial de tripanossomatídeos, kDNA. Apesar do estudo não obter amostras positivas na PCR Convencional, o que sugere uma carga parasitária abaixo de 10pg das amostras de *swabs* de conjuntiva ocular e secreção oral, Brito *et al* (2018)

obtiveram sucesso em isolar a *L. (V.) braziliensis* em saliva de pacientes residentes de área endêmica do Nordeste.

Em 2017, Boni *et al* ao utilizar *swabs* para o diagnóstico de LT alcançaram uma sensibilidade e especificidade do ensaio de PCR com alvo kDNA de 92,6% e 80%, respectivamente, e uma comparação entre amostras de *swab* e amostras de biópsia mostrou uma taxa de concordância de 86,2%. Brito *et al* (2012) relatou o sucesso no diagnóstico da LT através do *swab* de lesão e a PCR Convencional. Em 2011, Bogglid *et al*, obtiveram uma sensibilidade e especificidade da PCR com escova de citologia de 99,1% e 100%, respectivamente, a técnica foi aplicada em 90 pacientes com lesões sugestivas de LT, assim, pode-se afirmar a eficiência da técnica de PCR convencional.

A qPCR vem sendo empregada como uma ferramenta importante e eficaz no diagnóstico e monitoramento de doenças como hepatites, câncer e leishmaniose. O sistema SYBR Green utilizado é baseado do estudo da qPCR de Paiva-Cavalcanti *et al* (2013), no qual foram utilizadas amostras de sangue de cães tendo como principal alvo os minicirculos do kDNA contendo 138pb, sendo gênero-específico para *L. (V.) spp.*, com limite de detecção até 1fg.

Nesse estudo, a PCR em tempo real demonstrou ter uma maior sensibilidade e especificidade frente a PCR convencional ao utilizar os *swabs* de conjuntiva ocular e secreção oral para detecção da *L. (V.) braziliensis*. Ainda, as referidas amostras de substrato de conjuntiva ocular frente aos de substrato oral obtiveram melhor desempenho quanto a sensibilidade, especificidade e acurácia na qPCR. Resultados semelhantes com a utilização de *swabs* e métodos moleculares são vistos no estudo de Lombardo *et al* (2012) ao utilizar a qPCR para o diagnóstico de leishmaniose visceral (LV) em amostras coletadas a partir de *swab* oral e conjuntivas de cães.

Gomes *et al* (2017) ao avaliar o desempenho do *swab* de lesão na qPCR, obtiveram como resultado a detecção da *Leishmania* em uma proporção maior de pacientes com LT na qPCR que a histopatologia, esfregaço ou cultura resultando em baixa concordância diagnóstica, além de testar a sensibilidade do sistema SYBR Green e TaqMan, encontraram maior acurácia no sistema SYBR Green. *Swabs* de lesão e amostras de biópsia obtiveram valores de sensibilidade semelhantes quanto aplicados a qPCR pelo sistema SYBR Green.

Blaizot *et al* (2021) observou no estudo uma boa concordância entre os resultados da qPCR SYBR Green em amostras de *swab* de lesão e PCR-RFLP em amostras de biópsia de pele, mas a qPCR em *swabs* apresentou a maior sensibilidade. Esses resultados evidenciam que a qPCR é capaz de substituir o uso de testes tradicionais parasitológicos isoladamente ou em paralelo e, também, ter um desempenho adequado utilizando métodos de coletas menos invasivos.

A quantificação realizada pela qPCR das amostras positivas em sua totalidade demonstra cargas parasitárias baixas, o que reflete na discordância de resultados com a PCR Convencional, que a negatividade do teste não é indicativo da ausência do parasito, portanto, sugerem uma menor sensibilidade de detecção do método. Sendo relevante avaliar a carga parasitária adquirida na amostragem não invasiva (SUAREZ *et al* 2015; SERVILHA-SANTOS *et al.*, 2019). Comparando as técnicas moleculares no estudo, estatisticamente a qPCR demonstra melhor desempenho que a PCR Convencional uma vez que o valor de p foi $< 0,05$, indicando a diferença entre os métodos.

A utilização de métodos de coletas menos invasivas é uma ferramenta válida e interessante que busca simplificar a amostragem, principalmente, em ambientes onde os recursos são limitados, permitindo maior flexibilidade na coleta, transporte e armazenamento, além de favorecer a utilização de vários substratos como de lesão, secreção ocular e salivar, evitando o uso do raspado, aspirado e biópsia que requerem mais recursos e são meios mais dolorosos tanto para o humano como para o animal. Nesse sentido, os *swabs* assumem uma importância que podem contribuir no diagnóstico e somado à técnicas moleculares sensíveis proporcionam melhor monitoramento epidemiológico de áreas endêmicas para LT.

6 CONCLUSÃO

O uso do *swab*, coleta menos invasiva, em associação com testes moleculares pode ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico da LT.

A qPCR demonstrou melhor desempenho principalmente em amostras de *swabs* de conjuntiva ocular. A detecção do DNA da *L. (V.) braziliensis* em substratos de conjuntiva ocular corrobora como um novo eixo de diagnóstico nas investigações epidemiológica da LT.

Uma coleta menos invasiva é de extrema importância devido à rapidez, praticidade no manejo e menor incômodo ao animal, associada à metodologia de detecção mais sensível, rápida e específica que os métodos tradicionais permitem a triagem, diagnóstico e rastreamento de reservatórios da *Leishmania* spp. em casos de baixa carga parasitária e subclínicos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro v. 74, n. 1, p. 8, 27 Maio 2008.
- ANDRADE MS, et al. New outbreak of American tegumentar leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.5, p.594-596, 2009.
- ARONSON N, JOYA C. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**. Mar; 33(1):101-117, 2019.
- BASANO S; CAMARGO L. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Set, 2004.
- BLAIZOT R, et al. Validation of *Swab* Sampling and SYBR Green-Based Real-Time PCR for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana. **J Clin Microbiol**. 2021.
- BOGGILD AK, et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR Diagnostic Testing in Mucosal Leishmaniasis: Superior Performance to Conventional Biopsy with Histopathology. **A PLoS Um**. 2011.
- BONI SM, et al. Efficiency of noninvasive sampling methods (*swab*) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2017;59:e38. Published 2017.
- BRANDÃO-FILHO SP, et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, p. 575-578, 1998.
- BRANDÃO-FILHO, SP. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- BRANDÃO-FILHO SP, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- BRANDÃO-FILHO SP, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p. 291-296, 2003a.

BRITO ME, et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 203–206, 1 mar. 2001.

BRITO ME, et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2445–2448, out. 2008.

BRITO ME, et al., Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Barcelona, v. 14, n.10, p.1278–86, 2009.

BRITO ME, et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. **Case reports in dermatological medicine**, v. 2012.

BRITO ME, et al., Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** vol.45, 2012.

BRITO ME, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, 2018.

CORVALAN FH. et al. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98- 102, 2011.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*, **Veterinary Parasitology**, Volume 149, Issues 3–4, Pages 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 43, n. 6, p. 733–736, dez. 2010.

DAOUI O. et al. The role of sampling by cotton swab in the molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Transboundary and Emerging Diseases** Volume68, Issue4 Pages 2287-2294, July 2021.

DE BRUIJN MH; BARKER DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop**, Basel, v.52, n.1, p.45-58. 1992.

BURZA S, CROFT S, BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**. Sep 15;392(10151):951-970, 2018.

ERESH S.; MCCALLUM, S; BARKER, D. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**. London,v. 109, n. 04, p. 423, nov. 1994.

FIGUEROA RA, et al. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Vannia*) species. **Journal Infectious Diseases**. 2009.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

GALATI EA. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: **Rangel EF.; Lainson R. Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 53-175.

GALLUZZI L, CECCARELLI M, DIOTALLEVI A. et al. Aplicações de PCR em tempo real para diagnóstico de leishmaniose . **Vetores de parasitas** 11 , 273 2018.

GOMES CM, et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Is Endemic. **Journal Clinical Microbiology**. 2017.

GONTIJO B, CARVALHO M. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (1), Jan. 2003.

ITO M, et al. Correlation between presence of leishmaniose RNA vírus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniose. **Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e cirurgia Cérvico-facial**,v. 81, n. 5, p.533-540.2015.

LAINSON R; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Peters & Killick Kendrick Eds. p. 1-119. **London: Academic Press**, 1987.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, p. 10-17, 2012.

Maia-Elkhour NA, et al. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington. **Organização Pan-Americana da Saúde**. (2021). Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?seq>> Acesso: 1 set. 2022.

MACHADO G; PRATES; MACHADO P. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. Continuing Medical Education. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. 94 (1) Jan-Feb 2019.

MARINHO-JÚNIOR, JF. **Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar américa associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.p 103. 2015.

MIMORI, et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Trop**, Basel, 81:197-202,2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, et al. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, 2017. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manualvigilancialeshmaniosetegumentar.pdf>> Acesso: 23 jun. 2022.

NEVES D; LINARDI P; VITOR R. **Parasitologia humana**.14ª. São Paulo: Atheneu, 2016.

NOVAIS C; PIRES-ALVES M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.

PAIVA CAVALCANTI, et al. **The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood**. Vet J189:356–358. 2009.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Quantitative real time PCR assays for the detection *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**. London. p. 1-7, 2013.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2010. RODRIGUES EH, *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**. Washington. v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**,New York, 1989.

SATOW M, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Nov-Dec;55(6):393-9,2013.

SERVILHA-SANTOS et al. Acurácia da qPCR para quantificar o kDNA de *Leishmania* em diferentes camadas da pele de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. **Clinical Microbiology and Infection**. 2019.

SCHWARTZ E, HATZ C, BLUM J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 342–349, 2006.

SILVA, A.O da. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de Leishmania (Viannia) spp.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. p 77.2017.

SILVA C, et al. Leishmania V. braziliensis infection in asymptomatic domestic animals within an endemic region in the Northeast of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2022.

SUÁREZ M, et al. A quantificação do DNA cinetoplástico de Leishmania (Viannia) em úlceras de leishmaniose cutânea revela variabilidade inter-sítio e inter-amostragem na carga parasitária. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2015.

TORRES-GUERRERO E, et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v.6, p. 750, 26 maio 2017.

WILSON SM. DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: Fields applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 89, n. 1, p. 95-100, 1995.

WORTMANN GW, et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. Transactions of the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, p. 148-151, 2004.

ZHU H, et al. PCR past, present and future. **Biotechniques**. 2020 Oct;69(4):317-325.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer Comitê Ética em Uso com Animais – CEUA/FIOCRUZ-PE

 Mir Istórie da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA/CPqAM)

Recife, 17 de outubro de 2011

Carta - Resposta

Projeto nº 17/2011

Ao pesquisador: **SINVAL PINTO BRANDÃO FILHO.**
 Informo que o projeto **ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOLVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO.** proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em reunião do dia 28/07/2011, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação.

Cordialmente,



 Dr^a. Eridan Medeiros Coutinho
 Coordenadora/CEUA/CPqAM.

Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
 Pesquisadora Emérita de FIOCRUZ
 Coordenadora de CEUA/CPqAM
 Recife - Brasil

Aprovado (X)

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.570-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2500 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

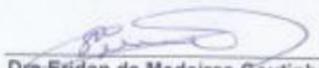
Certificado de Aprovação

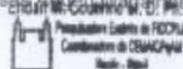
Certificamos que o Projeto intitulado: "ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOVVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO" protocolado sob o Nº 17/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) Sinval Pinto Brandão Filho está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 28/07/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até mês de março 2015.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie - linhagem	Nº de Animais
Hamster	500/ano Macho adulto 100g
TOTAL	500

We certify that the project entitled "ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOVVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO" (CEUA Protocol Nº 17/2011), coordinated by SINVAL PINTO BRANDÃO FILHO according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on July 28, 2011. In the present version this project is licensed and valid until March 2015.

Recife (PE, Brazil) October 17, 2011.


Dra Eridan de Medeiros Coutinho
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ



Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus de UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2500 Fax: (81) 3453-1911
www.fiocruz.br/ceua

ANEXO B

Autorização para atividades com finalidade científica – IBAMA/MMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-3	Data da Emissão: 09/08/2013 18:36	Data para Revalidação*: 08/09/2014
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colonização de <i>Bolomyia lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Gale a sprei</i> e <i>Rattus rattus</i>	08/2007	08/2012
2	Colonização de <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	08/2007	08/2012
3	Realização de ensaios de infeciosidade	08/2007	08/2012
4	Coleta de pequenos roedores e flebotomíneos	02/2011	08/2012

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES)
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Francisco Gomes de Carvalho	Biólogo responsável pela capturas	125.053.664-20	405657 SSP-CE	Brasileira
2	Gerlane Tavares de Souza Chioratto	Médica Veterinária	027.420.304-92	4881818 SSP-PE	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO VICENTE FERRER	PE	Mundo Novo	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42246384



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-3	Data da Emissão: 09/08/2013 18:36	Data para Revalidação*: 08/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

2 VICENCIA	PE	Imbu	Fora de UC Federal
3 AMARAJI	PE	Refrigerio	Fora de UC Federal
4 PAUDALHO	PE	CIMNC	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Lutzomyia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Lutzomyia (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Lutzomyia

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	cradouro científico
2	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Instituição de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42246384



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-3	Data da Emissão: 09/08/2013 18:36	Data para Revalidação*: 08/09/2014
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42246384



Página 4/4