

ÁDRIA DE OLIVEIRA CASTRO

AVALIAÇÃO DO SWAB ORAL COMO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRA NÃO INVASIVA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* NO ESTADO DO PARÁ.

BELÉM-PA

2022

ÁDRIA DE OLIVEIRA CASTRO

AVALIAÇÃO DO SWAB ORAL COMO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRA NÃO INVASIVA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* NO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciada em Biologia.

Orientadora: Dra. Patrícia Karla Santos Ramos
Co-orientadora: Dra Ivoneide Maria da Silva

BELÉM-PA

2022

ÁDRIA DE OLIVEIRA CASTRO

AVALIAÇÃO DO SWAB ORAL COMO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRA NÃO INVASIVA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* NO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciada em Biologia.

Orientadora: Dra. Patrícia Karla Santos Ramos
Seção de Parasitologia, IEC.

Co-orientadora: Dra Ivoneide Maria da Silva
Departamento de Parasitologia, UFPA.

Avaliadora: Rafaela dos Anjos Pinheiro Bogoevich Morais
Seção de Parasitologia, IEC.

Avaliador: Sérgio Marcelo Rodríguez Málaga
Departamento de Parasitologia, UFPA.

BELÉM-PA

2022

...Cada história tem um final. Mas, na vida, cada final é um recomeço. Por isso, nunca pare de acreditar...

Grande menina, pequena mulher (2003); As aventuras de Pi (2012).

Dedico este trabalho à memória do meu padrinho, Anderson Fernandes, que sempre me apoiou. E aos meus pais, que deram todo suporte para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, devo agradecer a Deus por todas as dádivas recebidas, principalmente, pela força e saúde, ao longo desses 10 semestres. Agradeço, também, à Nossa Senhora que, por muitas vezes, foi meu refúgio em horas de desespero.

Meus eternos agradecimentos: À minha mãe, Francirlei Pessoa, por ser minha inspiração de mulher, de força e de resistência, obrigada por mover montanhas para que hoje eu estivesse me formando. Ao meu pai, André Castro, que esteve comigo quando precisei. Aos meus irmãos, em especial, ao Fernando Medeiros, que esteve ao meu lado ao longo desses anos, à minha tia, Ercília Pessoa, aos meus avós Dirce Pessoa e Francisco Melo e ao meu primo Diego Mira, muito obrigada! Vocês são meu alicerce, amo todos!

Agradeço a Universidade Federal do Pará, que me recebeu, abriu portas e possibilitou que eu visualizasse o mundo de maneira diferente. Ao Instituto de Ciências Biológicas e todo o corpo docente que me auxiliou até hoje, no final desse ciclo.

Agradeço ao Instituto Evandro Chagas, à coordenação do PIBIC/IEC e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À minha orientadora, professora Dra Patrícia Ramos, agradeço pela oportunidade de ingresso a pesquisa, pela paciência, pelos ensinamentos e por todos os conselhos.

Agradeço a prof^a Dra Ivoneide Silva, que aceitou ser minha co-orientadora, nesta etapa de conclusão do curso.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, coordenador do Laboratório de Leishmanioses 'Prof Dr Ralph Lainson', o meu muito obrigada por todo o aprendizado ao longo desses anos, foram de grande importância.

Aos meus amigos de bancada: Lucas Pantoja, Rodrigo Furtado e Adriel Leal. Gratidão! Foi incrível trabalhar e aprender com vocês neste período. Meus agradecimentos, também, todos os pesquisadores e técnicos do Laboratório de Leishmanioses 'Prof Dr Ralph Lainson' pelo auxílio, amizade e cuidado. Obrigada, "Vila do chaves"!

Aos presentes que a Biologia me deu: Dyjardan Barbosa, Raissa Serrão, Luis Rogério Correa e Samara Pinto. Desejo o melhor para vocês. Obrigada pela parceria de todos esses anos, por cada abraço, por cada conversa, por cada puxão de orelha. Que essa amizade perdure por anos!

Agradeço imensamente à Aline Viana, minha amiga e parceira, que esteve ao meu lado, desde o início, me dando força, me apoiando, me incentivando. Obrigada pelo companheirismo, pela paciência e pelo carinho de sempre!

Aos meus companheiros de viagem (retorno das aulas): Rafael Ferraz, Gabriel Borges e Gleidson Alves, obrigada pela companhia e pelas conversas.

Para finalizar, gostaria de agradecer a todos que passaram pela minha vida neste período e, que de alguma maneira, participaram, direta ou indiretamente, para que eu estivesse concluindo minha graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas. Fica aqui o meu muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	13
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA - LVA	13
1.2.1 Gênero <i>Leishmania</i> e ciclo biológico	13
1.2.2 Doença	14
1.2.3 Epidemiologia da LVA no Brasil	15
1.2.4 Epidemiologia da LVA no Estado do Pará	17
1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	19
1.3.1 Exame clínico	19
1.3.2 Métodos laboratoriais	19
1.3.2.1 Exames sorológicos	19
1.3.2.2 Exames parasitológicos	19
1.3.2.3 Exame molecular	20
1.3.3 Métodos de coleta	21
1.3.3.1 Punção aspirativa	21
1.3.3.2 Coleta de sangue	21
1.3.3.3 “Swab” oral	21
1.4 JUSTIFICATIVA.....	22
1.5 OBJETIVO GERAL.....	23
1.5.1 Objetivos específicos	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	24
2.2 PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA	24
2.3 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO.....	24
2.3.1 Critérios de inclusão e exclusão	25
2.3.2 Riscos e benefícios do estudo	26

2.4 COLETA DE AMOSTRAS	26
2.4.1 Sangue	26
2.4.2 Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral.....	26
2.4.3 Cultivo de parasitos	27
2.4.4 Controles positivos e negativos	27
2.5 TESTE SOROLÓGICO	27
2.6 OBTENÇÃO DO DNA	28
2.6.1 Soro	28
2.6.2 Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral.....	28
2.6.3 Cultivo de parasitos	29
2.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	29
2.8 CONDIÇÕES DE CICLAGEM DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	30
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3. RESULTADOS	31
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8. ANEXOS.....	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1- Classificação taxonômica do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 1- Leishmaniose: formas evolutivas e hospedeiros.....	14
Figura 2- Incidência de leishmaniose visceral no segundo nível administrativo subnacional, por 100.000 habitantes, Região das Américas, 2020.....	16
Figura 3- Ilustração da taxa de incidência de casos de LVA, divididos por biênios..	18
Figura 4- Condução dos processos do estudo desde o encaminhamento ao IEC, atendimento pelo médico responsável pelo laboratório de leishmanioses ‘Prof. Dr. Ralph Lainson’, assinatura de termos, coleta de amostras, extração de DNA, até a ciclagem das amostras.....	25
Tabela 2- Visualização geral de dados coletados durante o estudo.....	31
Tabela 3- Características da população do estudo.....	32
Figura 5- Especificidade dos primers LEISH-1/LEISH-2 frente a outras espécies de <i>Leishmania</i>	33
Figura 6- Especificidade dos primers RV1/RV2 frente a outras espécies de <i>Leishmania</i>	33
Figura 7- Teste utilizando os primers RV1/RV2 com amostra de paciente suspeito de LVA e paciente com <i>L.(L.) amazonensis</i>	34
Figura 8- Teste utilizando os primers LEISH-1/LEISH-2 com amostra de paciente suspeito de LVA e paciente com <i>L.(L.) amazonensis</i>	35
Tabela 4- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “swab” Vs Sorologia; qPCR ¹ - utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2.....	36
Tabela 5- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “swab” Vs Sorologia; qPCR ² - utilizando o par de primer RV1/RV2.....	36
Tabela 6- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “Soro” Vs Sorologia (IgG); qPCR ¹ - utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2.....	37
Tabela 7- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas Soro Vs Sorologia (IgG); qPCR ² - utilizando o par de primer RV1/RV2.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

µL - Microlitro

CAAE - Certificado de apresentação para apreciação ética.

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EPC - Equipamentos de Proteção Coletivos

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

gDNA - Ácido Desoxirribonucleico Genômico

IEC – Instituto Evandro Chagas

LV - Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

NNN - Novy-Nicolle- McNeal

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - pares de base

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

RIFI- Reação da Imunofluorescência Indireta

RPM - Rotações por minuto

RPMI -1640 Roswell Park Memorial Institute medium 1640

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SOAMU – Setor de Atendimento Médico Unificado

RESUMO

AVALIAÇÃO DO “SWAB ORAL” COMO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRA NÃO INVASIVA PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL POR *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* NO ESTADO DO PARÁ

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA), é uma doença de evolução crônica causada, no Brasil, pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Apresenta quadro clínico súbito ou gradual e, na ausência de diagnóstico e tratamento adequados, esse quadro pode evoluir a óbito. Por isso, a pesquisa de métodos alternativos de extração de DNA, que sejam rápidos, práticos, livres de contaminação e eficazes em relação à quantidade, qualidade e possibilidade de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é importante, devido a sua possibilidade de aplicação em métodos diagnósticos. Assim, a utilização da saliva, coletada a partir do “swab”, considerado um método de coleta não invasivo, possui potencial atrativo no teste laboratorial para o diagnóstico da LVA. Visto que, na maioria dos casos, os pacientes estão debilitados por conta da doença. Com isso, o objetivo deste estudo foi: Avaliar a eficiência do “swab” oral na detecção de Leishmaniose Visceral por *L. (L.) i. chagasi* e comparar os resultados com os da sorologia e com o soro utilizado na qPCR. indivíduos residentes em área endêmica de leishmaniose visceral no Estado do Pará. Neste trabalho, foram realizadas coletas de amostras de “swab” e soro de 17 pacientes, originando 34 amostras, as quais foram submetidas à qPCR. Foi possível detectar o DNA de *L. (L.) i. chagasi* em células da mucosa oral, coletadas através do “swab”, em 64,70% (11/17), utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2. Com os resultados preliminares deste estudo, verificamos que o par de primer LEISH-1/LEISH-2 foi mais sensível para *L. (L.) i. chagasi* quando comparado com o par RV1/RV2 que obteve apenas 52,95% (09/17) de detecção para o DNA do parasita. Os resultados descritos apontam para a possibilidade da utilização das células da mucosa oral no diagnóstico da LVA quando empregada a qPCR, podendo constituir uma alternativa não invasiva de investigação.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, “Swab”, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses, consideradas um complexo de doenças, que possuem caráter infeccioso não contagioso, com um amplo espectro de manifestações clínicas, possuindo duas formas principais: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e são transmitidas por vetores pertencentes à família Psychodidae, gênero: Flebotominae. Com ocorrência mundial, a leishmaniose é uma doença negligenciada, sendo endêmica em 98 países, constituindo um problema de saúde pública de grande relevância pois atinge, principalmente, pessoas em situação de fragilidade socioeconômica (BRASIL, 2017; STEVERDING, 2017; VASCONCELOS DOS SANTOS & SILVEIRA, 2020).

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA – LVA

1.2.1 Gênero *Leishmania* e ciclo biológico

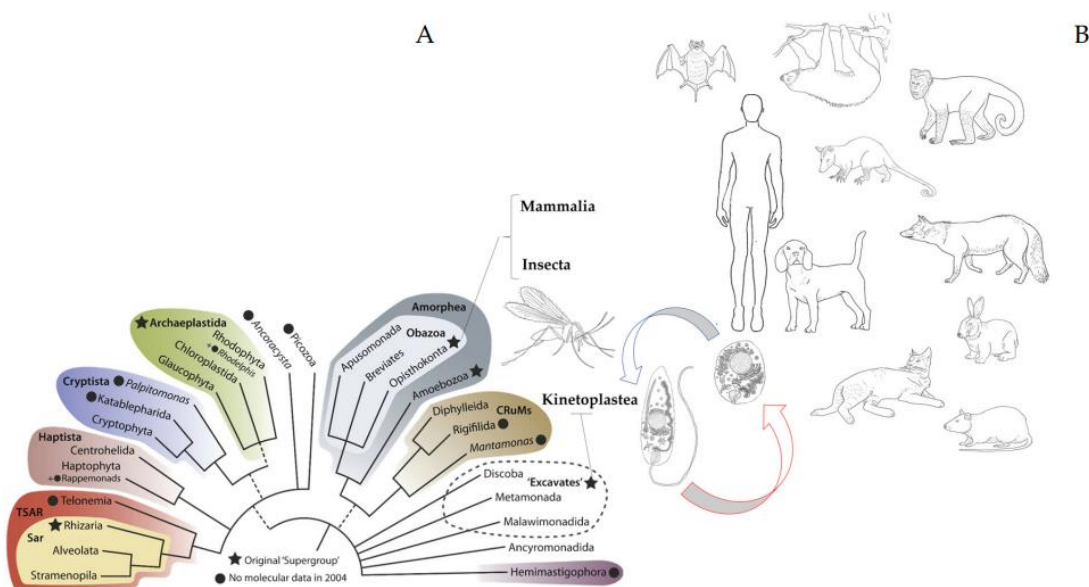
As leishmanias são parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes a ordem Trypanosomatida, da família Trypanosomatidae (Tabela 1), que possuem um ciclo de vida digenético, ou seja, exige um hospedeiro vertebrado que seja suscetível e um inseto vetor. Seu ciclo biológico se inicia com o repasto sanguíneo, a partir da picada da fêmea do flebotomíneo infectada, a qual inocula as formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro. Essas formas são fagocitadas por macrófagos, onde sofrem alterações morfológicas, transformando-se nas formas amastigotas as quais se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear até romper o macrófago e liberar as formas amastigotas no meio intercelular. A partir disso ocorre a reinfeção e o ciclo se inicia novamente (Figura 1). (LAINSON, 2010; AGUIAR & RODRIGUES, 2017; ANVERSA *et al*, 2018).

Tabela 1- Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*.

Classificação das espécies neotrópicas de <i>Leishmania</i> (LAINSON, 2010)	
REINO	Protozoa: Goldfuss, 1818
FILO	Euglenozoa: Cavalier-Smith, 1998
CLASSE	Kinetoplastea: Honigberg, 1963
ORDEM	Trypanosomatida: Kent, 1880
FAMÍLIA	Trypanosomatidae: Doflein, 1901
GÊNERO	<i>Leishmania</i> : Ross, 1903
SUBGÊNERO	<i>Leishmania</i> : Ross, 1903

Fonte: Elaborado pela autora do trabalho

Figura 1- Leishmaniose: formas evolutivas e hospedeiros. (A) Árvore evolutiva eucariótica com foco no supergrupo Opisthokonta: que inclui a subclasse Mammalia (hospedeiros vertebrados), Classe Insecta (flebotomíneos); e Excavata - Kinetoplastea (*Leishmania*). (B) Formas evolutivas das espécies de *Leishmania* e hospedeiros.



Fonte: Gabriel *et al.*, 2020 (Adaptado)

1.2.2 Doença

A LV, nas Américas, é chamada de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neotropical, é uma doença de evolução crônica causada, no Brasil,

pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* = *Leishmania chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 2005)

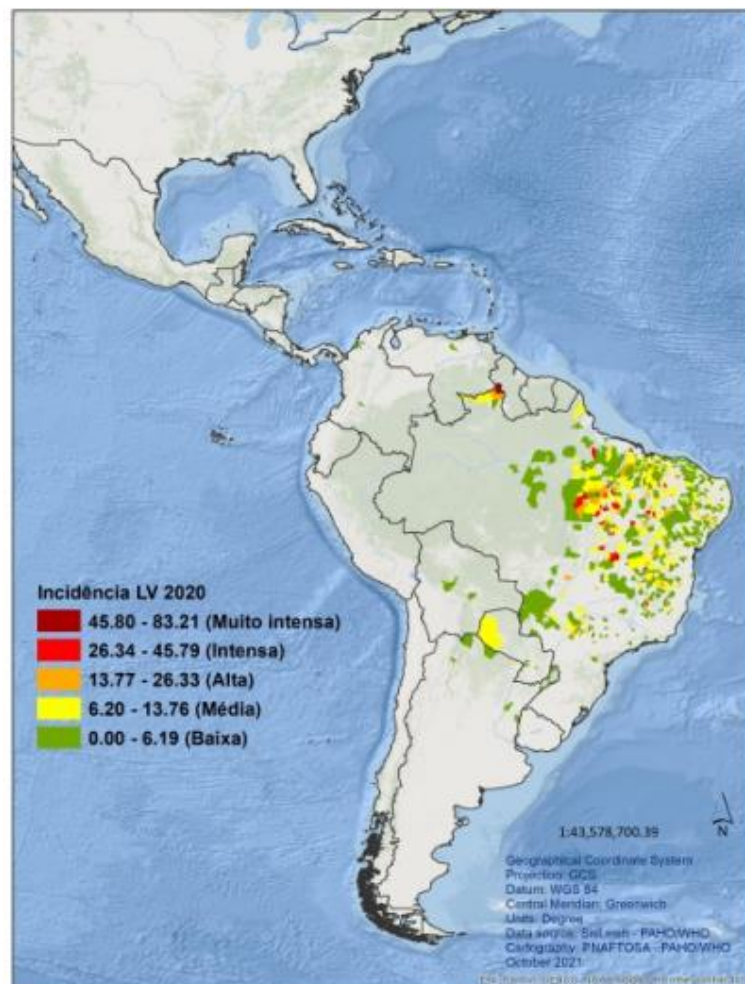
Apresenta quadro clínico súbito ou gradual, com febre diária, que pode persistir por meses, assim como fraqueza e indisposição, perda do apetite e conseqüente emagrecimento, palidez e, pelo parasito ter tropismo por órgãos viscerais, distensão abdominal. Possui um período de incubação que dura, em média, de 2 a 6 meses e na falta de diagnóstico e tratamento adequados, esse quadro pode evoluir a óbito, o que ocorre em até 98% dos casos não tratados (MICHALICK *et al.*, 2016; SILVEIRA, 2016).

O tratamento da doença, no Brasil, ocorre com a utilização de compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes e a formulação disponível no país é o antimoniato N-metil glucamina, que é distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 mL. Para evitar os riscos de transmissão é recomendado o uso de repelentes, telas, mosquiteiros e saneamento ambiental (BRASIL, 2014).

1.2.3 Epidemiologia da LVA no Brasil

No Brasil, a LVA apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Isso mostra que os diversos ecossistemas favorecem a manutenção dos vetores de forma diferente (BRASIL, 2014; SILVA *et al.* 2016). Ver Figura 2.

Figura 2- Incidência de leishmaniose visceral no segundo nível administrativo subnacional, por 100.000 habitantes, Região das Américas, 2020. O maior número de casos em 2020 são os mesmos notificados pelos municípios de 2019, no Brasil: Fortaleza (Estado do Ceará), São Luís (Maranhão), Belo Horizonte (Minas Gerais), Teresina (Piauí), Parauapebas (Pará), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Araguaína e Marabá (Tocantins). As maiores taxas de incidência também foram apresentadas no Brasil: Sapucaia (Pará), Mariápolis (São Paulo), Maetinga (Bahia), Uiramutã (Roraima), Darcinópolis e Lajeado (Tocantins) e Buritinópolis (Goiás).



Fonte: Organização Pan Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]. Núm. 10, dezembro de 2021.

A LVA teve sua origem na área rural, mas o processo de migração e urbanização desordenada, aliados à falta de saneamento e condições precárias de moradia, fizeram com que a doença avançasse para os subúrbios das grandes

idades brasileiras. Além disso, a deficiência ou ausência de serviços de saúde nas localidades, capacitação inadequada dos profissionais de saúde quanto a suspeição diagnóstica, tal como o controle ineficaz de recursos para diagnóstico e tratamento são fatores que corroboram para a expansão da doença no país (REY *et al.* 2005; MONTEIRO SPINELLI *et al.*, 2021).

1.2.4 Epidemiologia da LVA no Estado do Pará

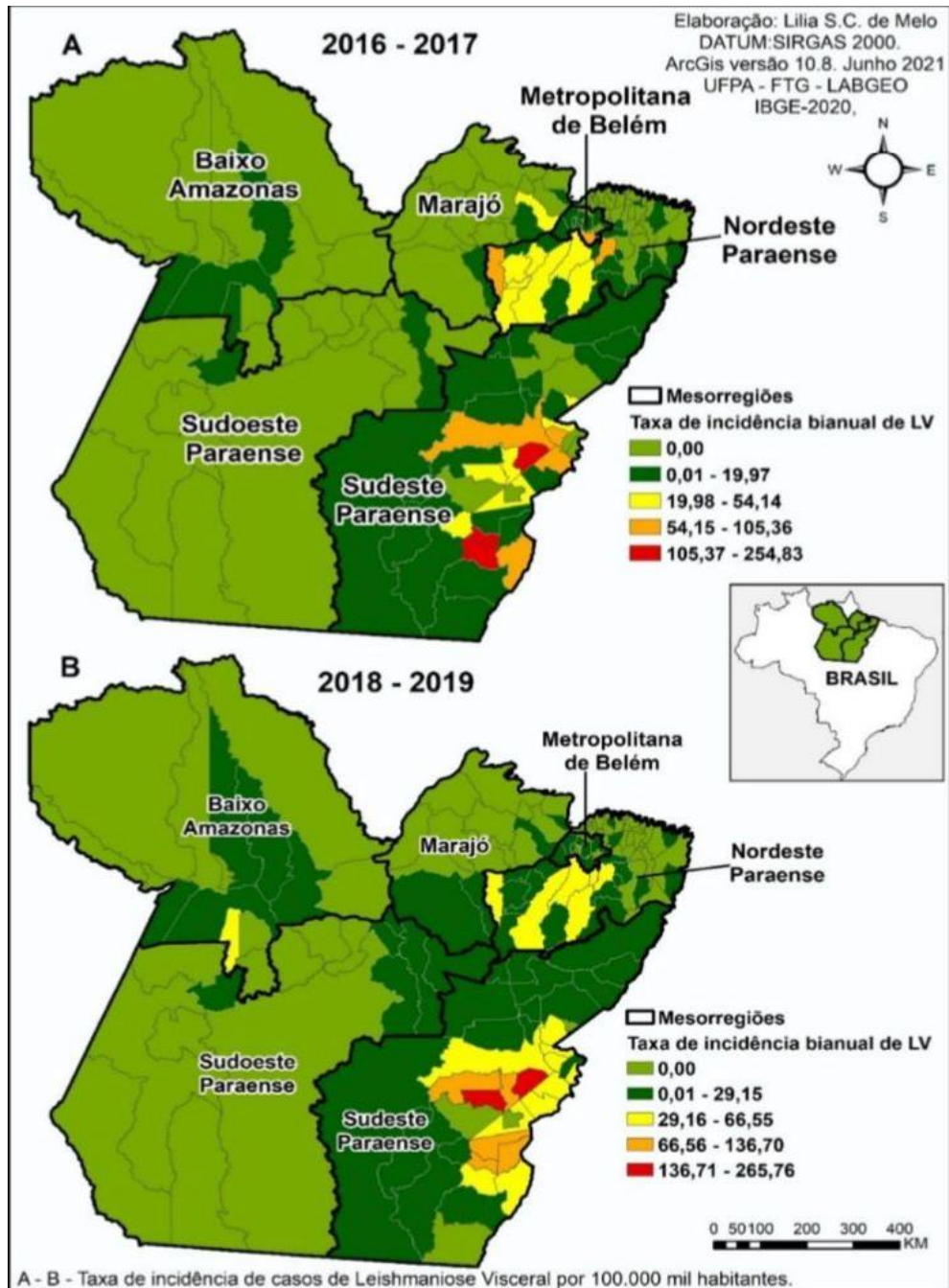
A LVA, na Amazônia brasileira, foi registrada pela primeira vez em 1934, com três casos da doença no Pará. Após a morte prematura de Evandro Chagas, em 1940, as observações sobre a LVA se limitavam a poucos estudos clínicos, apresentando características estritamente rurais e de ambientes silvestres. A partir da década de 1980, a doença assumiu um novo perfil epidemiológico que permitiu uma maior notificação dos casos, havendo, ainda a expansão destes, para outras áreas do Estado como na ilha do Marajó, na região oeste, Baixo Amazonas. A LVA é estabelecida de maneira endêmica e/ou epidêmica em diversas microrregiões do estado do Pará. (SILVEIRA, *et al.*, 2008; SILVEIRA., *et al*, 2016; COSTA, 2018)

Segundo dados do INPE, o estado do Pará, dentre os estados da Amazônia Legal, é o que apresenta a maior área de desmatamento acumulado, com cerca de 45.030,22 km² (41.76%). Esse é um fator que contribui para o aumento no número de casos de doenças, principalmente por provocar mudanças ambientais, esvaziamento rural e urbanização crescentes. Com isso, expansão da LVA para zonas urbanas do Estado, é reflexo de impactos ambientais, como construção de rodovias e pontes, polos industriais, hidrelétricas e, assim, o provável deslocamento de cães infectados para zonas urbanas das cidades, visto que os cães possuem importante papel dos cães na epidemiologia da LVA, e somado a baixa condição socioeconômica e a precariedade de saneamento básico, contribui para a instalação de condições necessárias a transmissão da leishmaniose visceral. (BARBOSA, 2016; LIMA *et al.*, 2017; INPE, 2022).

No mapa que ilustra a taxa de incidência de casos de LVA no Pará no período de 2016 a 2019, observa-se que no primeiro biênio (2016-2017) houve maior concentração dos casos no Sudeste e no Nordeste Paraense, porém com menores taxas; enquanto no segundo biênio (2018-2019) percebeu-se a concentração dos

casos nas mesmas Mesorregiões, com maiores taxas de incidência, porém com dispersão dos casos para alguns municípios das regiões do Marajó, Baixo Amazonas e Sudoeste Paraense. (Figura 3)

Figura 3- ilustração da taxa de incidência de casos de LVA, divididos por biênios.



FONTE: Silva A.S. d. et al., 2022. Dados elaborados no Laboratório de Geoprocessamento de dados epidemiológicos da Universidade Federal do Pará (2020).

1.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

1.3.1 Exame clínico

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral é realizado a partir dos sintomas como febre, palidez de mucosas, esplenomegalia associado ou não à hepatomegalia, anemia, associados a residência em áreas endêmicas. No entanto, deve-se ter atenção especial para outras doenças que apresentam sintomatologia similar, sobretudo onde ocorrem sobreposições na distribuição de doenças como malária, toxoplasmose, esquistossomose, como é o caso do estado do Pará. (BRASIL, 2014; WHO, 2022)

1.3.2 Métodos laboratoriais

1.3.2.1 Exames sorológicos

O exame imunológico mais utilizado no Brasil é a Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos. O resultado da RIFI é expresso em diluições e são considerados positivas diluições a partir de 1:80. O teste ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não. (BRASIL, 2014; AGUIAR & RODRIGUES, 2017)

1.3.2.2 Exames parasitológicos

Podem ser realizados o exame direto de parasitas, no qual, em uma lâmina limpa é realizado o esfregaço com material aspirado (medula óssea, biópsia hepática ou aspiração de linfonodos) para visualização das formas amastigotas do parasita (devem ser examinados 200 campos antes de se considerar uma lâmina como negativa); e Isolamento em meio de Cultura (*in vitro*) utilizando o meio de cultura NovyMacNeal-Nicolle (NNN) ou Isolamento em Animais Susceptíveis (*in vivo*) com inoculação experimental em hamsters. (BRASIL, 2014)

1.3.2.3 Exame molecular

A técnica mais utilizada no diagnóstico das leishmanioses, é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que se apresenta como um método sensível e específico para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. devido a ampla variedade de amostras biológicas que podem ser utilizadas. É um teste de base molecular utilizado na identificação de gênero e espécie de *Leishmania*. A detecção de PCR em tempo real é bastante utilizada no diagnóstico e acompanhamento da doença, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito, o que contribui para o avanço da epidemiologia molecular de doenças infecto-parasitárias, como a LVA. A técnica permite a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores anelados especificamente nas margens da região alvo. Para realização do teste, é necessária uma enzima Taq polimerase, o qual permite a desnaturação do DNA, anelamento (hibridização) dos oligonucleotídeos iniciadores ou primers às sequências alvos complementares e extensão, para a amplificação da sequência alvo. Sendo de extrema importância a escolha dos primers utilizados nas reações de PCR e qPCR, visto que permitem diferenciar espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. (FRANCINO *et al.*, 2006; GALLETTI *et al.*, 2011; NEITZKE-ABREU *et al.*, 2013; ALEXANDRE, 2015).

Além da sensibilidade diagnóstica utilizando esse método, outras vantagens deste teste molecular são a rapidez com que pode ser realizado e a variedade de amostras que podem ser utilizadas para análise. Os métodos simples de coleta, como o “swab” em associação com os protocolos de extração de DNA e primers adequados para o diagnóstico da doença promove a redução no tempo para o diagnóstico da LV, a otimização do teste e evitaria procedimentos de coleta invasivos e dolorosos ao paciente que já se encontra debilitado pela doença. (ALEXANDRE, 2015; BONI, 2016)

Todos os membros da família Trypanosomatidae, a qual pertence o gênero *Leishmania*, contêm um cinetoplasto situado na base do flagelo. Esse cinetoplasto é o DNA mitocondrial, composto por minicírculos (com cerca de 10.000 cópias por parasita) e maxicírculos. É, exatamente, a região conservada dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA) que tem sido utilizada como alvo específico para ensaios de PCR convencionais ou quantitativos. A qPCR baseia-se na análise do sinal fluorescente, como SYBR Green ou sonda TaqMan, que é produzida durante a amplificação. O SYBR Green se liga inespecificamente às fitas duplas de DNA que

são geradas pela amplificação, sendo essa ligação nas moléculas de DNA que realiza a emissão de um forte sinal luminoso. Por isso a necessidade de escolher primers específicos para o teste, pois eles são os responsáveis pela multiplicação da sequência correta de DNA. (CECARELLI *et al.*, 2014; FERNANDES., 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018)

1.3.3 Métodos de coleta

1.3.3.1 Punção aspirativa

A punção aspirativa é utilizada para o diagnóstico parasitológico, com o objetivo de demonstrar o parasito na amostra coletada do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Contudo, na LV a amostra mais utilizada é a punção aspirativa de medula óssea. Esse material obtido é utilizado para confecção de esfregaço ou impressão em lâminas. Este método é considerado um procedimento invasivo, não sendo adequado para estudos epidemiológicos em larga escala. (SOUZA, 2019)

1.3.3.2 Sangue

A coleta do sangue para obtenção do soro é realizada para realização dos testes sorológicos. Esse método é considerado pouco invasiva quando comparado a punção aspirativa, no entanto, causa incomodo e dificuldades na hora de encontrar a veia para realizar a coleta sanguínea, devido ao paciente se encontrar debilitado pela doença e, as vezes, acaba sendo inviável realizar o procedimento. (SOUZA, 2019; AIRES, 2022)

1.3.3.3 “Swab” oral

O “swab” oral é um exame utilizado para a coleta de saliva e fluidos presentes na boca e orofaringe. Suas principais vantagens são a coleta indolor, de fácil execução, e não invasivo. Além disso, é um método que não exige privacidade ou isolamento. Esse exame analisa os fluídos bucais e as células para a identificação de microrganismos patógenos, com o intuito de direcionar o tratamento adequado à condição individual dos pacientes. (BRASIL, 2013; LUABEYA *et al* 2019)

1.4 JUSTIFICATIVA

As dificuldades na determinação da doença clínica devido à variabilidade e complexidade das manifestações da infecção, em razão de a LVA, no homem, apresentar sinais e sintomas comuns a outras patologias presentes nas áreas endêmicas à LV, assim como a grande diversidade de hospedeiros infectados, o que sugere variantes genéticas do parasito, além da ocorrer de indivíduos serem assintomáticos, direcionam o diagnóstico para os métodos laboratoriais alternativos. Por isso, desde a década de 80, técnicas de biologia molecular vêm sendo desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, demonstrando a importância do uso do DNA do cinetoplasto (kDNA) como alvo para a identificação e classificação de *Leishmania* spp. (RAY, 1987; RODRIGUEZ, 1994; GONTIJO & MELLO, 2004; CARVALHO NETA, A.V *et al.* 2006; FERNANDES, 2016; RAMOS *et al.*, 2021)

Alguns estudos apontam que a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em saliva e em células da mucosa oral pode ser uma opção na investigação parasitológica. A utilização da saliva, coletada a partir do “swab” bacteriológico, considerado um método de coleta não invasivo, possui potencial atrativo no teste laboratorial, pela detecção e caracterização dos microrganismos a partir de testes moleculares, como a Reação em cadeia da Polimerase (PCR). Esse método tem sido relatado na literatura para o diagnóstico de diversas doenças como tuberculose, coqueluche e, também para as leishmanioses. (MIMORI *et al.*, 2002; SALEM *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2011; CORVALAN, F.H. *et al.*, 2011)

A combinação entre coleta de “swab” e realização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada na prática clínica diária, como diagnóstico alternativo para as leishmanioses, pela facilidade da coleta, por não provocar desconforto ao paciente e ter boa sensibilidade. (FIGUEROA *et al.*, 2009; BOGGILD *et al.*, 2011; BONI, 2016).

Devido a isso, este trabalho propôs avaliar o uso do “swab” oral (uma amostra de fácil coleta, indolor e sem danos ao paciente) como método de coleta não invasivo, para o diagnóstico molecular de pacientes residentes em área endêmica de leishmaniose visceral no Estado do Pará.

1.5 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do "swab" oral na detecção de Leishmaniose Visceral por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em indivíduos residentes em área endêmica de leishmaniose visceral no Estado do Pará.

1.5.1 Objetivos específicos

- Detectar DNA de *Leishmania* nas células epiteliais esfoliativas da mucosa oral;
- Comparar a positividade do método de coleta de amostra "swab oral" com método de coleta de amostra considerada invasiva (sangue para obtenção de soro) levando em consideração os índices de concordância entre os resultados realizados com a qPCR do "swab" oral e a sorologia e a qPCR do soro e a sorologia;
- Comparar especificidade dos primers LEISH-1/LEISH-2 e RV-1/RV-2, na qPCR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Após autorização do diretor do Instituto Evandro Chagas (IEC), este projeto foi submetido ao comitê de ética em Pesquisa em Humanos e aprovado com o nº do CAAE: 91152518.5.0000.0019 e nº do parecer: 2.801.889 (Anexo A). Todos os indivíduos que atenderam aos critérios estabelecidos pelo projeto receberam esclarecimento quanto aos seus objetivos e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Voluntários ou o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (Anexo B, de acordo com as disposições da resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012 artigo IV.3 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. Diante do exposto, ressaltamos que foram garantidas a preservação do sigilo e da privacidade de dados (quer sejam pessoais, clínicos e epidemiológicos), bem como acesso restrito às referidas informações utilizando o controle de acesso segundo recomendações do Núcleo de gestão da qualidade institucional.

2.2. PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA

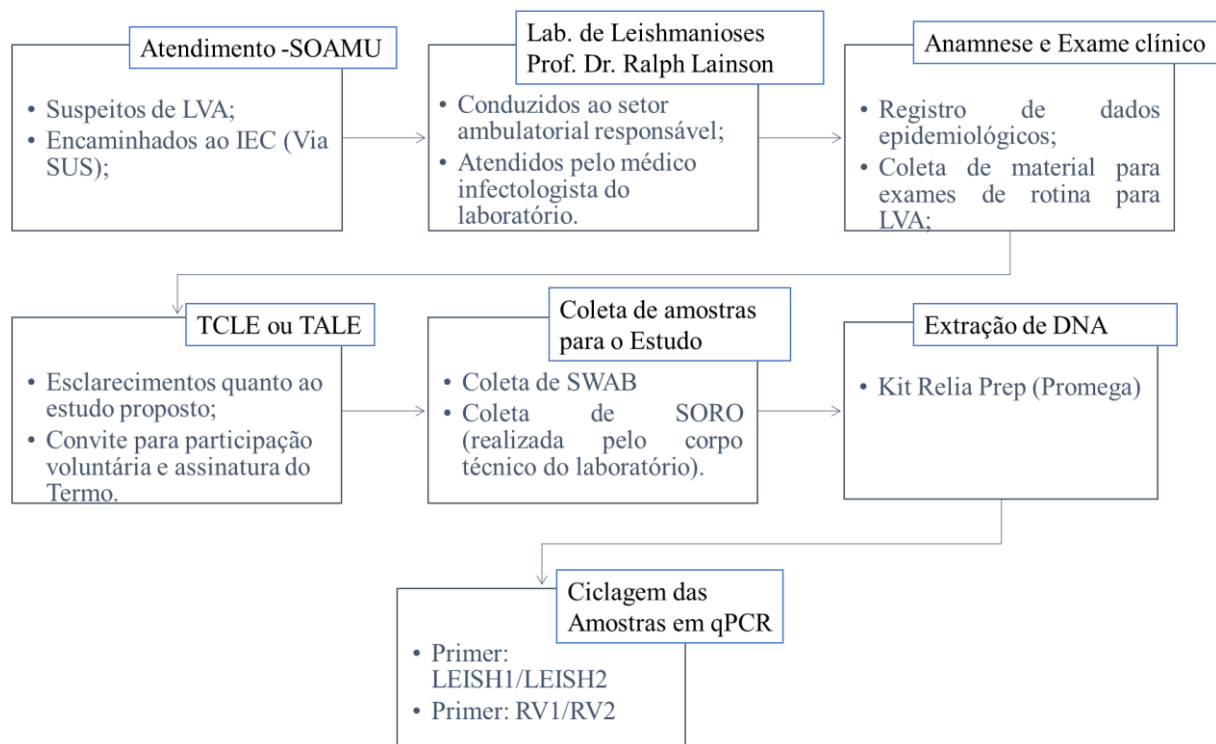
Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de “swab” e soros foram realizados observando-se as normas e critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança utilizando os equipamentos de proteção individual – EPI (óculos, jalecos, luvas, máscara,) e os equipamentos de proteção coletivos – EPC (cabine de segurança biológica classe II A2). Os materiais biológicos desprezados foram acondicionados em recipientes apropriados fornecidos pela comissão de biossegurança do IEC para posterior envio e recolhimento para fins de incineração realizada por empresa terceirizada. A manipulação de amostras biológicas e o uso de equipamentos de laboratório só começou a ser realizada após a conclusão do curso de Biossegurança (ofertado de forma presencial pelo IEC).

2.3 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO

Indivíduos suspeitos de leishmaniose visceral, no período entre 1º de agosto de 2018 a 31 de julho de 2019, foram encaminhados via SUS (demanda passiva) ao Instituto Evandro Chagas, na instituição foram atendidos pela equipe

médica do Serviço de Atendimento Médico Unificado do IEC (SOAMU-IEC) e posteriormente conduzidos ao setor ambulatorial do Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson” (quando havia suspeita de Leishmaniose Visceral) para avaliação clínica pelo médico infectologista do setor. Foram coletados e registrados os dados epidemiológicos dos pacientes durante a anamnese realizada pelo responsável do ambulatório. Após o exame clínico que compatível com LV, o paciente era informado sobre o estudo em questão e após as explicações por parte do médico foram entregues a cada participante o TCLE ou TALE para leitura e assinatura. (Figura 4)

Figura 4 - Organograma do estudo desde o encaminhamento ao IEC, atendimento pelo médico responsável pelo laboratório de leishmanioses ‘Prof. Dr. Ralph Lainson’, assinatura de termos, coleta de amostras, extração de DNA, até a ciclagem das amostras.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

2.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Neste estudo foram incluídos indivíduos de ambos os sexos e com faixas etárias distintas e excluídos menores com idade inferior ou igual a 1 (um) ano de vida.

2.3.2 Riscos e benefícios do estudo

Neste estudo as amostras coletadas foram extraídas e logo utilizadas para a realização dos testes no Laboratório de Biologia Molecular do laboratório de Leishmanioses 'Prof. Dr. Ralph Lainson'. Os riscos que dizem respeito à exposição dos dados pessoais, clínicos e epidemiológicos de cada paciente que teve sua amostra coletada foram mantidos em sigilo de acordo com as normas de biossegurança institucional. Os benefícios para os participantes serão de grande importância para ajudar, a saber, quem está doente, detectar o parasito e contribuir com a conduta terapêutica.

2.4 COLETA DE AMOSTRAS

Após consentimento dos pacientes foram realizadas as coletas de sangue, para obtenção do soro e realização da reação de imunofluorescência indireta - RIFI (rotina do laboratório); células da mucosa oral, para realização da qPCR. Havendo confirmação sorológica de leishmaniose visceral, os pacientes, no seu retorno, receberam a prescrição, medicação para tratamento (medicação injetável- fornecida pelo IEC/Ministério da Saúde) e orientações para retornarem após o término para nova avaliação clínica e laboratorial.

2.4.1 Sangue

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo estéril sem anticoagulante à vácuo. Deixou-se o tubo em repouso à temperatura ambiente, de 30 a 60 minutos, para retração do sangue e, posteriormente, centrifugado (15 minutos a 1562 G). Ao término o soro retirado com auxílio de uma pipeta pasteur estéril foi transferido para frasco estéril previamente identificado com o registro do paciente. Armazenou-se o material a -20 °C até o momento do uso.

2.4.2 Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral

Algumas precauções foram tomadas antes do início da coleta com o "swab" oral. Durante a anamnese, foi perguntado ao paciente se nos 30 minutos que haviam

antecedido sua chegada ao ambulatório se os mesmos haviam realizado a ingestão algum tipo de alimento (sólido ou líquido), feito uso de cigarros ou ainda “mastigado” chiclete. Em caso de negativa foram procedidas as coletas com auxílio de dois "swabs" rayon estéreis, friccionando a mucosa, girando a escovinha em 360 graus, no mínimo, 5 vezes em cada lado da bochecha. (SILVA, 2017) Ao término do procedimento foram acondicionados em tubos tipo eppendorf contendo solução salina fosfatada 1x estéril.

2.4.3 Cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *L. (L.) i. chagasi* (MCAO/2010/BR/27840-Barcarena/Pará), provenientes do criobanco do laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas ('Prof. Dr. Ralph Lainson'), foram cultivadas em meio NNN e posteriormente transferidas para o meio RPMI 1640 (sem fenol), pH 7.2 suplementado com soro bovino fetal a 10% e penicilina/estreptomicina a 1% para a obtenção de parasitos (fase estacionária). Após três repiques as formas promastigotas de *Leishmania* foram lavadas três vezes com solução tamponada de salina fosfatada – PBS (14 mM NaCl, 2,5 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7,4 mM Na_2HPO_4 , pH 7.2) e centrifugadas a 3.000 rpm por 5'. O pellet obtido foi armazenado a - 20°C.

2.4.4 Controles positivos e negativos

Como controles positivos, foram utilizados soros de pacientes com titulação igual ou superior a 10.240, definida pela RIFI; e como controles negativos, soros de indivíduos que nunca estiveram em área endêmica de LV.

Nos ensaios realizados na qPCR foram utilizados controles positivos provenientes de cultivo in vitro do parasito *L. (L.) infantum chagasi*, e como controles negativos a "mix" da PCR contendo água ultrapura.

2.5. TESTE SOROLÓGICO

A reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* foi executada pelo corpo técnico do setor de sorologia do laboratório de leishmanioses 'Prof. Dr. Ralph Lainson'. A que se mencionar que utilizamos apenas

os resultados cadastrados no livro de registro do referido setor. Foi utilizado como antígeno: cepa de *L. (L.) i. chagasi* (MCAO/2010/BR/27840-Barcarena/Pará), forma amastigota impregnada em lâmina de imunofluorescência com acetona. As lâminas foram acondicionadas em freezer -20 °C até o momento de uso.

2.6. OBTENÇÃO DO DNA

As extrações de DNA das células epiteliais esfoliativas da mucosa oral e soro, foram realizadas com o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, USA) originando um total de 2 amostras por paciente (1. amostra swab, 2. amostra soro).

2.6.1 Soro

Aos 400 µL de soro, adicionou-se 40 µL de proteinase K e 200 µL de Tampão de Lise Celular (vortex 10") e na sequência incubado a 56 °C/10'. Decorrida esta etapa, foi submetido a nova agitação (10") antes da adição de 250 µL de tampão de ligação, agitado 10", e transferido para coluna de extração, centrifugado a 14000 rpm/1', lavado 3 vezes com solução de lavagem, na etapa final a coluna de extração foi transferida para um tubo tipo eppendorf (1,5 mL) para adição de 25 µL de água livre de nuclease, finalizando com centrifugação a 14000 rpm/1' e posterior armazenagem do DNA a -20°C.

2.6.2 Células epiteliais esfoliativas da mucosa oral

O material coletado com "swab oral" para extração com o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, USA) foi embebido em 400 µL solução de PBS 1x, 20 µL de Proteinase K e 400 µL de Tampão de Lise Celular sendo agitado por 10" e incubado a 56°C/10'. Decorrida esta etapa foi agitado 10" e posteriormente adicionou-se 500 µL de tampão de ligação, foi submetido a agitação (10") e transferido para coluna de extração, centrifugado a 14000 rpm/1' e o swab descartado. Lavou-se 3 vezes com solução de lavagem, transferiu-se a coluna de extração para um tubo tipo eppendorf, foi adicionado 100 µL de água livre de nuclease, seguido por nova centrifugação a 14000 rpm/1' para armazenamento do DNA a -20°C.

2.6.3 Cultivo de parasitos

A cultura foi centrifugada a 5000rpm/3' para a retirada do sobrenadante. O pellet obtido foi resuspenso em 160uL de PBS 1x. Em seguida agitado em vórtex por 10". Foram adicionados 20uL de Proteinase K, posteriormente, 200 uL de Tampão de Lise Celular. Agitado novamente em vórtex 10" e incubado a 56 °C / 10'. Em seguida, adicionado 250uL de tampão de ligação, agitado em vórtex 10". O material foi transferido para a coluna de extração e centrifugado a 14000rpm/1', adicionado 500uL de solução de lavagem e centrifugado novamente a 14000rpm/1' (lavou-se 2 vezes). A coluna de extração foi transferida para um microtubo tipo eppendorf e adicionados 150uL água livre de nuclease, seguido de centrifugação a 14000rpm/1' para armazenamento do DNA a -20°C.

2.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação de DNA foi realizada no aparelho Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Scientific®) pelo corpo técnico do laboratório. Sendo utilizados 10ng de DNA nas reações de qPCR.

2.8 CONDIÇÕES DE CICLAGEM DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

O DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação, utilizando, em um primeiro momento, o par de primers 1) RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3') e RV2 (5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA - 3') que amplificam a região LT1 do minicírculo do kDNA para *L. infantum* gerando um produto de 145 pb (LE FICHOUX *et al.*, 1999) e, posteriormente, o par de primers 2) LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3) e LEISH-2 (5 -ACCCCCAGTTTCCCGCC-3) que amplificam uma sequência conservada com 120 pares de base encontrada no DNA dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania infantum* (FRANCINO *et al.*, 2006).

As reações para ambos os primers foram realizadas em um volume final de 20µL reação de PCR com 2x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega-USA), 2µM de cada iniciador, e 10ng de DNA. O perfil de ciclagem foi: 50°C por 2 minutos seguido de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C (desnaturação) por 15 segundos, 60°C

(anelamento/extensão) por 1 minuto e para a curva de dissociação 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 30 segundos. As reações ocorrem em termociclador (AriaMx Real Time PCR System - Agilent). Para garantir a reprodutibilidade dos ensaios, os testes foram reproduzidos em duplicata.

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas médias entre tempo de lesão, idade e sexo da população amostral em programa Excel 2016, assim como utilizado Índice de Kappa para avaliar a reprodutibilidade e concordância dos resultados dos testes moleculares em programa BioEstat 3.0.

3. RESULTADOS

Foram realizadas coletas de amostras de “swab” e soro de 17 pacientes, extraídas com kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, USA) para obtenção do DNA, originando 34 amostras, sendo 17 amostras de “swab” e 17 de soro, de acordo com a Tabela 2.

No que diz respeito às características na população deste estudo, o tempo de lesão/mês foi de aproximadamente 3,9 meses; a faixa etária média observada entre os pacientes foi de 31 anos. No que se refere a questão do gênero dos pacientes, observou-se que 47,06% (08/17) era do gênero masculino e 52,94% (09/17) do gênero feminino (Tabela 3).

Tabela 2 – Visualização geral de dados coletados durante o estudo. Legenda: Nº IEC - Registro do paciente no livro do Laboratório de Leishmanioses ‘Prof. Dr. Ralph Lainson’; Idade- em anos; Tempo da doença relatado pelo paciente- Tempo médio de surgimento/observação dos sintomas segundo o paciente; Gênero- como o paciente se identifica; Sorologia IqG- Diluições; PCR quantitativa em tempo real (qPCR)- 1 resultado positivo; 0 - resultado negativo.

Nº IEC	Idade	Tempo de doença relatado pelo paciente	Gênero	SOROLOGIA- IgG	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL - qPCR				
					LEISH1/LEISH2	RV1/RV2	Swab	Soro	
1	M33052	26	6 meses	F	1/10.240	1	1	1	1
2	M33053	36	1 mês	F	1/10.241	1	1	1	1
3	M33059	55	6 meses	M	1/10.242	1	1	1	1
4	M33122	19	3 meses	F	1/10.243	1	1	1	1
5	M33150	48	4 meses	F	1/10.244	1	1	0	1
6	M33185	34	15 dias	F	1/5.120	0	1	0	1
7	M33347	27	11 meses	F	1/5.121	1	1	1	1
8	M33367	22	2 meses	M	1/2.560	1	1	1	0
9	M33369	38	6 meses	M	1/10.240	1	1	1	0
10	M33398	47	3 meses	F	1/5.120	1	1	1	1
11	M33409	14	4 meses	M	NEGATIVO	0	0	0	0
12	M33498	37	2 meses	M	1/10.240	0	1	0	0
13	M33514	3	2 meses	M	1/5.120	0	1	0	0
14	M33521	57	3 meses	M	NEGATIVO	0	0	0	0
15	M33552	55	1 mês	M	1/10.240	1	1	1	1
16	M33563	64	10 meses	F	NEGATIVO	0	0	0	0
17	M33564	31	3 meses	F	1/10.241	1	1	0	0

Tabela 3 - Características da população do estudo; n (%) - número de pessoas e sua respectiva porcentagem em relação ao total de pacientes; Tempo de doença/mês- média do tempo da doença; Idade- média de idade, em anos, do total de pacientes; Desvio padrão da idade dos pacientes.

Características da população de estudo	
Gênero	
<i>Masculino n (%)</i>	8 (47.06)
<i>Feminino n (%)</i>	9 (52.94)
Tempo de doença/mês	3.94
Idade média dos pacientes	31
Desvio padrão da idade	16.74

Ao testar a especificidade *in vitro* dos primers LEISH-1/LEISH-2 e RV1/RV2, frente ao DNA de outras espécies de *Leishmania* presentes no estado do Pará, dentre elas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*., foi possível comprovar que ambos os primers apresentam temperatura de melting (T_m) a 80.5°C, portanto são mais específicos para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. (Figuras 5 e 6). Entretanto os ensaios com LEISH-1/LEISH-2 demonstraram resultados mais conclusivos, no qual se tem um único pico para *L. (L.) i. chagasi* e as outras espécies possuem picos mais distantes da espécie alvo. Enquanto que, ao avaliar a especificidade dos primers RV1/RV2, observou-se picos para outras espécies de *Leishmania*, próximos ao de *L. (L.) i. chagasi*, o que de certa forma acaba dificultando a análise dos resultados. (Figura 5)

Figura 5 - Especificidade dos primers LEISH-1/LEISH-2 frente a outras espécies de *Leishmania*.

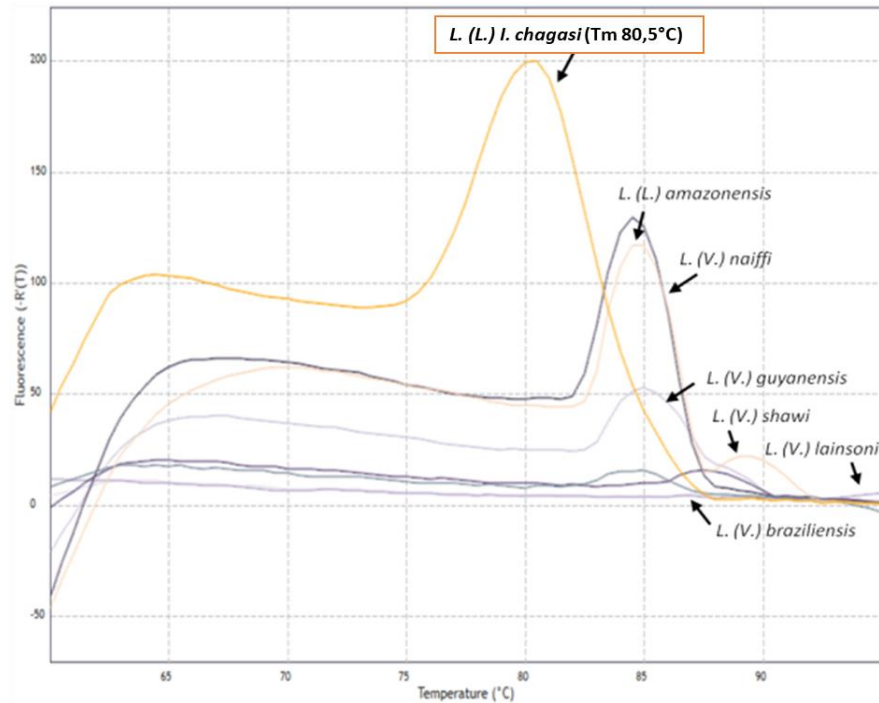
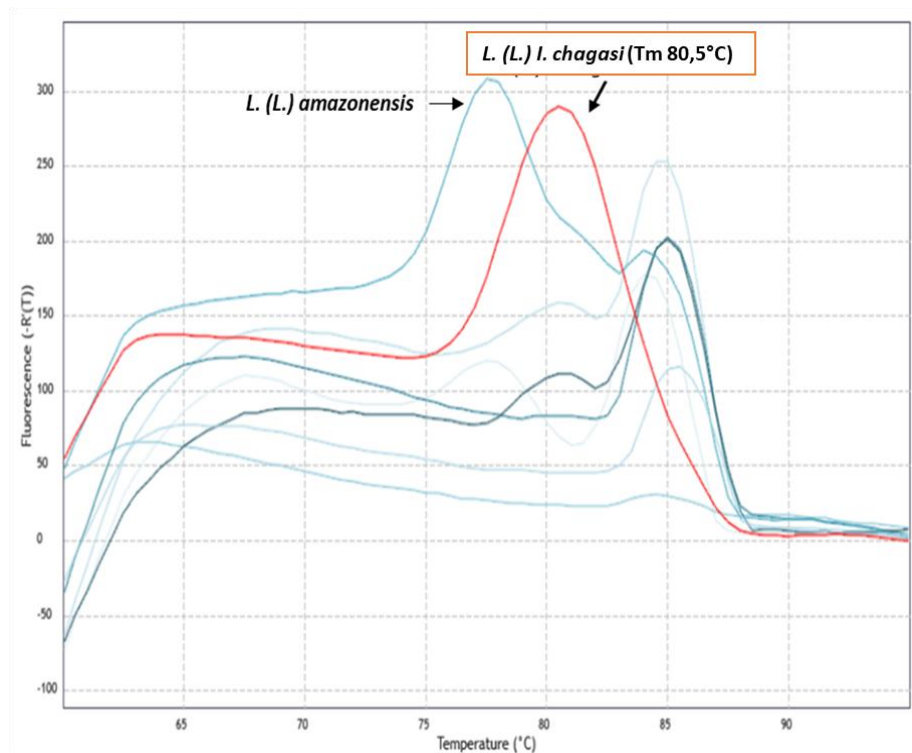


Figura 6 - Especificidade dos primers RV1/RV2 frente a outras espécies de *Leishmania*.



Ao realizar os testes com amostras de pacientes suspeitos de LVA e comparar com os resultados dos *in vitro*, observou-se que o primer LEISH-1/LEISH-2 também obteve resultados mais conclusivos, com picos de dissociação entre as amostras de pacientes com suspeita de LVA e com amostra de paciente com *L. (L.) amazonensis* mais distantes do que os testes utilizando o RV1/RV2. (Figura 7 e 8)

Figura 7 – Teste utilizando os primers RV1/RV2 com amostra de paciente suspeito de LVA e paciente com *L.(L.) amazonensis*.

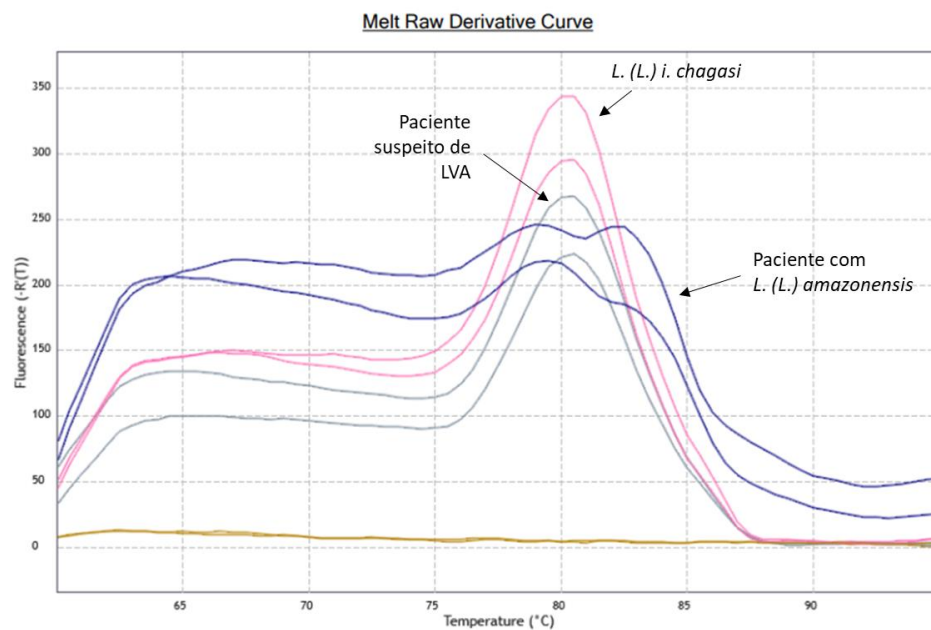
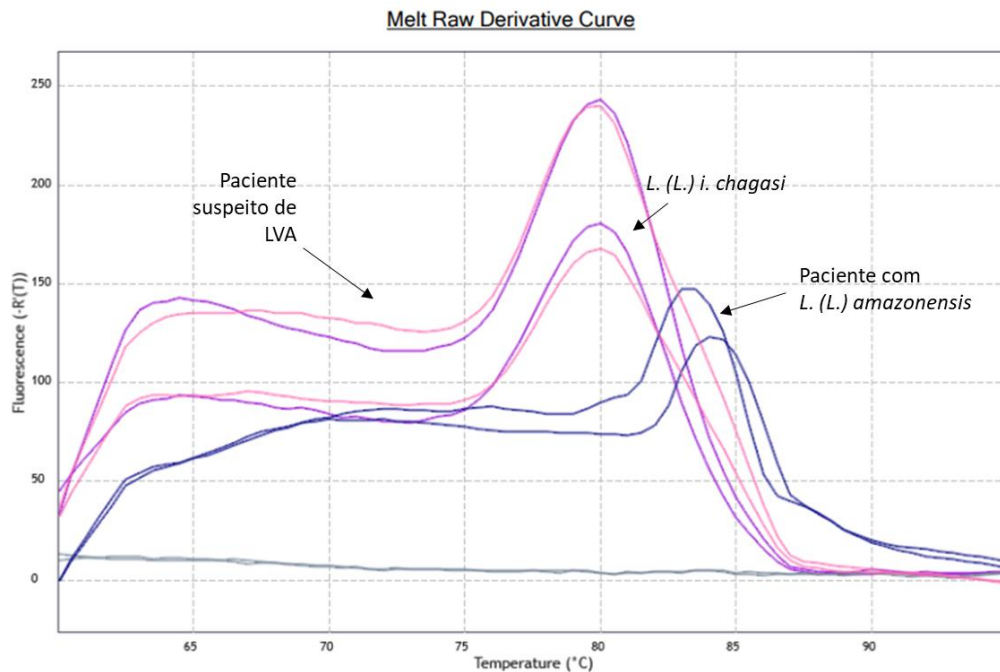


Figura 8 – Teste utilizando os primers LEISH-1/LEISH-2 com amostra de paciente suspeito de LVA e paciente com *L.(L.) amazonensis*.



O método utilizado no diagnóstico da LVA, no Lab. de leishmanioses prof. Dr. Ralph Lainson, é a RIFI e, como aponta a Tabela 1, dos 17 pacientes, aproximadamente, 16,60% (3/17) foram negativos e 83,4% (14/17) foram positivos para a doença.

Primeira análise, 'Swab' Vs Sorologia:

Utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2, foram positivos 64,70% (11/17) e 35,30% (6/17) apresentaram resultados negativos, sendo 17,65% equivalente aos pacientes que realmente foram negativos para LVA, segundo a RIFI e 17,65% foram negativos para qPCR e positivos na sorologia. A partir disso, a análise de concordância Kappa mostrou que há uma boa confiabilidade entre 'swab' e sorologia ($k = 0.564$), e uma concordância diagnóstica de 82,3% (Tabela 4). Ao utilizar o par de primer RV1/RV2, foram positivos 52,95% (09/17) e 47,05% (8/17) apresentaram resultados negativos, sendo 17,64% equivalente aos pacientes que realmente foram negativos para LVA e 29,41% foram negativos para qPCR e positivos na sorologia. A partir disso, a análise de concordância Kappa mostrou que há uma fraca confiabilidade entre swab e Sorologia ($k = 0.389$), e uma concordância diagnóstica de 70,6% (Tabela 5)

Tabela 4 - Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “swab” Vs Sorologia; qPCR¹ - utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2.

		qPCR ¹ Swab n (%)	
		Positivo	Negativo
Sorologia n (%)	Positivo	11 (64,70)	3 (17,65)
	Negativo	0 (0)	3 (17,65)
Concordância		0,823	
Kappa (k)		0.564	
Conclusão		Boa	

Tabela 5 - Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “swab” Vs Sorologia; qPCR² - utilizando o par de primer RV1/RV2.

		qPCR ² Swab n (%)	
		Positivo	Negativo
Sorologia n (%)	Positivo	9 (52,95)	5 (29,41)
	Negativo	0 (0)	3 (17,64)
Concordância		0,706	
Kappa (k)		0.389	
Conclusão		Fraca	

Segunda análise, Soro (qPCR) Vs Sorologia:

Utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2, foram positivos 82,35% (14/17) e 17,65% (3/17) apresentaram resultados negativos, estes equivalentes aos pacientes que realmente foram negativos para a LVA. A partir disso, a análise de concordância Kappa mostrou que há uma excelente confiabilidade entre Soro e Sorologia ($k = 0.824$), e uma concordância diagnóstica de 94,4% (Tabela 6). Ao utilizar o par de primer RV1/RV2, foram positivos 52,94% (09/17) e 47,05% (08/17) apresentaram resultados negativos, sendo 17,65% equivalente aos pacientes que realmente foram negativos para LVA e 29,41% foram negativos para qPCR e positivos na sorologia. A partir disso, a análise de concordância Kappa mostrou que há uma fraca confiabilidade entre swab e Sorologia ($k = 0.389$), e uma concordância diagnóstica de 70,6% (Tabela 7)

Tabela 6- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas “Soro” Vs Sorologia (IgG); qPCR¹ - utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2.

		qPCR ¹ Soro n (%)	
		Positivo	Negativo
Sorologia n (%)	Positivo	14 (82,35)	0 (0)
	Negativo	0 (0)	3 (17,65)
Concordância		0,944	
Kappa (k)		0.824	
Conclusão		Excelente	

Tabela 7- Análise sobre a concordância diagnóstica entre as amostras biológicas Soro Vs Sorologia (IgG); qPCR² - utilizando o par de primer RV1/RV2.

		qPCR ² Soro n (%)	
		Positivo	Negativo
Sorologia n (%)	Positivo	9 (52.94)	5 (29.41)
	Negativo	0 (0)	3 (17,65)
Concordância		0,706	
Kappa (k)		0.389	
Conclusão		Fraca	

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico para leishmaniose, utilizando como alvo o minicírculo do kDNA é considerado o método mais sensível, pois existem milhares de cópias por parasita (COSTA, 2019) diferente dos maxicírculos que compõem apenas algumas dezenas de cópias (GALLUZZI, L, *et al.*, 2018). As reações utilizando a região do minicírculo, amplificam regiões conservadas específicas de gênero e subgênero (BENSOUSSAN, E, *et al.*, 2006).

A finalidade desse estudo foi avaliar o emprego do “swab” oral na detecção de DNA de *L. (L.) i. chagasi*, já que há uma escassez na literatura acerca desse substrato para o diagnóstico da LVA em humanos. Em 2015, o trabalho de Alexandre, conseguiu detectar o DNA *Leishmania* spp. em saliva, coletadas a partir do “swab”, combinados a PCR em tempo, ratificando que a utilização da saliva como alvo diagnóstico para leishmanioses demonstra a alta sensibilidade e especificidade da técnica molecular usada (qPCR) aliada a um sistema de primers específicos para kDNA. Isto contribui para os achados deste estudo e para a literatura, já que esse método é pouco descrito na literatura.

No que diz respeito às características na população deste estudo, a faixa etária observada teve uma média de 31 anos, entrando em concordância com Silva & Gaioso (2013), que demonstraram maior frequência da doença entre 20 e 34 anos. Entretanto, quando se refere a questão do gênero dos pacientes, observou-se que as pessoas do gênero feminino tiveram maior frequência de detecção, confrontando o estudo anteriormente citado, esse resultado pode estar relacionado às atividades laborais realizadas pelas mulheres em peridomicílio e extradomicílio, ocasionando maior exposição à doença. O estudo de Gontijo & Mello (2004) demonstra que em alguns focos urbanos existe tendência de modificação na distribuição das características da população amostral, o que pode ter ocorrido nessa pesquisa.

Lombardo *et al.* (2012), assim como o presente trabalho, utilizou a técnica de qPCR para detecção de DNA de *Leishmania (L.) infantum* em amostras coletadas a partir de “swab” oral, porém em cães, e as comparou com métodos clássicos e seus resultados demonstraram a aplicabilidade da associação de métodos não invasivos com a técnica de PCR em tempo real.

A utilização do soro no teste da qPCR apresentou bons resultados, nessa pesquisa, onde todas as amostras que apontaram resultado positivo na RIFI (método padrão do laboratório), foram positivas na qPCR. O que não ocorreu no estudo de

Rolim *et al.*(2016), onde, nas análises realizadas, a detecção do DNA de *Leishmania* utilizando os primers direcionados ao cinetoplasto do parasita foi possível em 25 dos 30 soros positivos para a LV. Gonçalves L. P. et al. (2019) verificaram que a combinação das técnicas RIFI e qPCR auxiliam no diagnóstico da infecção por *L. (L.) i. chagasi*, sendo importante a associação dessas técnicas de diagnósticos, visto que conseguiram detectar o DNA do parasita em oito amostras a mais no método da qPCR, em comparação com a RIFI. Sendo o intuito dessa combinação: contribuir no diagnóstico da infecção por *L. (L.) i. chagasi* e no controle da LV.

Com relação aos primers, ao utilizar o par de primer RV1/RV2, observou-se que seu pico de dissociação foi com TM 80,5 °C, sendo específico para *Leishmania (L.) i. chagasi*. Mas sua análise apresenta inespecificidade frente ao DNA de outras espécies (WANDERLEY, 2011). Obteve-se, nesta pesquisa, um pico de *L. (L.) amazonensis* próximo ao de *L. (L.) i. chagasi*, o que pode dificultar a análise na hora do diagnóstico. Diferente do ocorrido com o par de primer LEISH-1/LEISH-2, onde os picos de dissociação de outras espécies de *Leishmania* foram distantes. Francino *et al.* (2006) desenharam esse par de primer para amplificar uma região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania (L.) i. chagasi*, entretanto, utilizando sonda na reação, tornando-a mais específica. No presente estudo, a sonda foi substituída por SYBR Green, o que poderia torná-la menos específica. Contudo, assim como no estudo de Ferraz (2015), foi observado apenas um único pico de dissociação com Tm característica (80,5°C), permitindo diferenciar outras espécies de *Leishmania*.

A técnica da qPCR tem aberto caminhos para um diagnóstico mais eficiente e uma melhor compreensão da infecção por *Leishmania* spp. (BONI, 2016), principalmente por apresentar mínimo risco de contaminação, pouca manipulação do material e rapidez nos resultados. Estes dados corroboram aos resultados deste estudo que, embora, tenha tido um número pequeno de pacientes, foi possível constatar que há sensibilidade no teste de qPCR, já que, a coleta das células da mucosa oral, aliada a técnica, evidenciou a ocorrência do parasita no substrato, sinalizando a aplicação do método para o diagnóstico rápido da Leishmaniose Visceral.

5. CONCLUSÃO

- A detecção do DNA de *L. (L.) i. chagasi* a partir da combinação das técnicas: qPCR e “swab” (coleta de células da mucosa oral) é possível. Contudo, a negatividade observada em 3 amostras de ‘swab’, utilizando o par de primer LEISH-1/LEISH-2, de pacientes que tiveram sorologia positiva (RIFI), pode estar associada a ingestão por parte do paciente de comida ou bebida minutos antes da coleta (fato não relatado por eles);
- Neste estudo, a qPCR utilizando a amostra biológica “soro” obteve maior concordância com o método da RIFI;
- O par de primer LEISH-1/LEISH-2 foi mais sensível para *L. (L.) i. chagasi* quando comparado ao RV1/RV2.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos apontam para a possibilidade da utilização das células da mucosa oral no diagnóstico da LVA quando empregada a qPCR, podendo constituir uma alternativa não invasiva de investigação, visto que é uma amostra de fácil obtenção principalmente quando se trata de enfermos, recém-nascidos, crianças e idosos que estão debilitados por conta da doença, além de não haver a necessidade de anestesia local para coleta. Contudo, um maior número amostral faz-se necessário para confirmação deste trabalho preliminar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 2016, 10 (3), nº e0004349. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004349

ALEXANDRE J. L. DE A. **Diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana utilizando a saliva coletada com swab**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2015

ALMEIDA, I. A. Z. C., et al. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo, 2001-2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 8, n. 90, p. 16-23, 2011.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira** 2018, 64 (3), 281–289. DOI: 10.1590/1806-9282.64.03.281

BARBOSA, I. R. Leishmaniose Visceral Humana no município de Natal-RN: análise clínico epidemiológico e espacial. **Revista Ciência Plural**. 2016. v. 2, n. 1, p. 89-101.

BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A.; JONAS, F.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology** 2006, 44 (4), 1435–1439. DOI: 10.1128/jcm.44.4.1435-1439.2006

BONI, S. M. **Avaliação de método diagnóstico não invasivo para leishmaniose tegumentar americana através da reação em cadeia da polimerase**. 2016. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-06012017-113026/>. Acesso em: 11 março 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: ANVISA;2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 30 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância de leishmaniose tegumentar**. Brasília, DF, 2017.

BURKI, F.; ROGER, A. J.; BROWN, M. W.; SIMPSON, A. G. B. The New Tree of Eukaryotes. **Trends in Ecology & Evolution** 2020, 35 (1), 43–55. DOI: 10.1016/j.tree.2019.08.008

CARVALHO NETA, A. V.; ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 2006, 58 (4), 480–488. DOI: 10.1590/s0102-09352006000400005

CECCARELLI, M.; GALLUZZI, L.; MIGLIAZZO, A.; MAGNANI, M. Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **PLoS ONE** 2014, 9 (2), nº e88845. DOI: 10.1371/journal.pone.0088845

CORVALAN, F.; SAMPAIO, R.; BRUSTOLONI, Y.; ANDREOTTI, R.; LIMA JÚNIOR, M. 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** 2011, 17 (1), 98–102. DOI: 10.1590/s1678-91992011000100013

COSTA, E. M. **Aplicabilidade de testes rápidos para vigilância e controle da leishmaniose visceral canina em áreas endêmicas**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

COSTA, R. T. M. **Urbanização da Leishmaniose Visceral na região do Baixo Tocantins, Pará, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, Belém, 2018.

FERNANDES, M. A. **Aspectos clínicos e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** Universidade de São Paulo, 2016.

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-09082017-084543/> (acedido em 27/06/2022).

FERRAZ, M. A. **Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.** 2016.

PublishedVersion — Universidade de São Paulo, [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-20042016-120453/>.

FIGUEROA, R. A.; LOZANO, L. E.; ROMERO, I. C.; CARDONA, M. T.; PRAGER, M.; PACHECO, R.; DIAZ, Y. R.; TELLEZ, J. A.; SARAVIA, N. G. Detection of Leishmania in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)* Species. **The Journal of Infectious Diseases** **2009**, *200* (4), 638–646. DOI: 10.1086/600109

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis.

Veterinary Parasitology **2006**, *137* (3-4), 214–221. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.011

GABRIEL, Á. M.; GALUÉ-PARRA, A.; PEREIRA, W. L. A.; PEDERSEN, K. W.; DA SILVA, E. O. *Leishmania* 360°: Guidelines for Exosomal Research. **Microorganisms** **2021**, *9* (10), 2081. DOI: 10.3390/microorganisms9102081

GALLETTI, E.; BONILAURI, P.; BARDASI, L.; FONTANA, M. C.; RAMINI, M.; RENZI, M.; DOSA, G.; MERIALDI, G. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Research in Veterinary Science** **2011**, *91* (2), 243–245. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.01.004

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors** **2018**, *11* (1). DOI: 10.1186/s13071-018-2859-8

GONCALVES, L. P. ; CASTRO, A. O. ; TRINDADE, E. C. ; LIMA, L. V. R. ; SILVEIRA, F. T. ; RAMOS, P. K. S. Diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em cães de área endêmica no estado do Pará. In: **VIII Congresso de Educação em Saúde da Amazônia, 2019**, Belém. VIII COESA, 2019.

GONTIJO, C. M. F. & MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-790x2004000300011>.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Terra Brasilis**. 3 jun. 2022. Disponível em: http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/app/dashboard/deforestation/biomes/legal_amazon/increments. Acesso em: 19 jun. 2022.

LAINSON R & SHAW J.J. Leishmaniasis in the New World. *In*: Collier L, Balows A, Sussman M (eds) **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**, 2005, 10th ed., vol 5, Parasitology. Arnold, London, pp 313–349.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13-32, jun. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>.

LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J.-F.; AUFEUVRE, J.-P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **Journal of Clinical Microbiology** 1999, 37 (6), 1953–1957. DOI: 10.1128/jcm.37.6.1953-1957.1999

LIMA, L. V. D. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; RAMOS, P. K.; LAURENTI, M. D.; TEIXEIRA, C. E. C.; SILVEIRA, F. T. Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. **Parasite** 2017, 24, 37. DOI: 10.1051/parasite/2017039

Lombardo, G.; Pennisi, M. G.; Lupo, T.; Migliazzo, A.; Caprì, A.; Solano-Gallego, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology** 2012, 184 (1), 10–17. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.08.010

Luabeya AK et al. Noninvasive detection of tuberculosis by oral swab analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(3):e01847-18.

MICHALICK, M. S. M.; RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M. da. Leishmaniose Visceral Americana. *In*: **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. p. 69-90.

MIMORI, T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Basel, v.81(3), p.197-202, 2002.

MONTEIRO SPINELLI, J. L.; REFORÊDO DA SILVA VENTURA, A. M.; TOBIAS SILVEIRA, F.; CALDAS RIBEIRO, B.; DIAS NUNES, S. E.; COSTA DA SILVA, R. Análise espacial, clínico-epidemiológica e laboratorial de crianças internadas com leishmaniose visceral no Pará/Amazônia Brasileira. **Saúde Coletiva (Barueri)** 2021, 11 (68), 7629–7646. DOI: 10.36489/saudecoletiva.2021v11i68p7629-7646.

NEITZKE-ABREU, H. C.; VENZAZZI, M. S.; BERNAL, M. V. Z.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; VAGETTI, F.; MOTA, C. A.; SILVA, N. R.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE** 2013, 8 (7), nº e62473. DOI: 10.1371/journal.pone.0062473

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]**. Núm. 10, dezembro de 2021.

Washington, D.C.: OPS; 2021. Disponível em:
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.

RAMOS, P. K. S.; GONÇALVES, L. P.; ALVES, A. C. O.; CASSEB, S. M.; LIMA, L. V. D. R.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS DOS SANTOS, T.; SILVEIRA, F. T. Urine qPCR diagnoses over the entire clinical-immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infections in the Brazilian Amazon. **Parasitology International** 2021, 81, 102273. DOI: 10.1016/j.parint.2020.102273

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: High-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, v. 17, n. 3, p. 177-190, maio 1987. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/0147-619x\(87\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0147-619x(87)90026-6).

REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **Jornal de Pediatria** 2005, 81 (1). DOI: 10.1590/s0021-75572005000100014

RODRÍGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology** 1994, 32 (9), 2246–2252. DOI: 10.1128/jcm.32.9.2246-2252.1994.

ROLIM, F.; CARVALHO, F. L. N.; GEHLEN, G. L.B.; GEHLEN, M.; HALON, M. L.; LEMOS, R. R.; BARCELLOS, R. B.; ROSSETT, M. L. Leishmaniose visceral canina:

detecção de DNA em soro por PCR em tempo real. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.14 p.36-46, 2016. Disponível em:
<http://posgrad.ulbra.br/periodicos/index.php/ic/article/view/2341/2002>.

SALEM, J. I. et al. PKO - Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, Manaus, v.37, p. 419 – 424, 2007.

SILVA, A. S. D.; SILVA, M. V. S. D.; REIS, D. S. T. D.; COUTO, D. C. C.; PINTO, D. D. S.; MELO, L. S. C. D.; COSTA, D. C. D. S.; FARIAS, T. C. B.; MAROJA, M. C. F. D. S.; BARROS, S. H. P. D. Perfil epidemiológico e distribuição espacial da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Revista Eletrônica Acervo Saúde 2022**, 15 (6), nº e10242. DOI: 10.25248/reas.e10242.2022

SILVA, E. S.; GAIOSO, A. C. I. Leishmaniose visceral no estado do Pará. **Rev. para. Med**, 2013. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-681359>.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUZA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira 2016**, 36 (7), 625–629. DOI: 10.1590/s0100-736x2016000700011

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; PEREIRA, E. A.; DE SOUZA, A. A. A.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. **Parasitology Research 2008**, 104 (3), 559–567. DOI: 10.1007/s00436-008-1230-y.

SILVEIRA, F. T.; LIMA, L. V. D. R.; SANTOS, T. V. D.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde 2016**, 7 (esp), 15–22. DOI: 10.5123/s2176-62232016000500003

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 15 fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.

VASCONCELOS DOS SANTOS, T. SILVEIRA, F. T. Increasing putative vector importance of *Trichophoromyia phlebotomines* (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2020**, 115. DOI: 10.1590/0074-02760190284

WANDERLEY, L. B. **Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

WHO | **World Health Organization.** Disponível em:
<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em:
6 abr. 2022.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do swab oral como método de coleta de amostra não invasiva para o diagnóstico molecular de indivíduos suspeitos de leishmaniose visceral por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi no Estado do Pará

Pesquisador: Patrícia Karla Santos Ramos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01152518.5.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.801.889

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa "Avaliação do swab oral como método de coleta de amostra não invasiva para o diagnóstico molecular de indivíduos suspeitos de leishmaniose visceral por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi no Estado do Pará" apresenta elevada relevância científica por se tratar de um tema relacionado com o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana que se baseia na execução de testes sorológicos (ELISA ou Reação de Imunofluorescência indireta) que por vezes podem demonstrar resultados falsos positivos ou falsos negativos, dificultando desta forma a conclusão diagnóstica. Na tentativa de dirimir esta situação ferramentas moleculares vem sendo empregadas. A PCR vem sendo utilizada em muitas pesquisas para resolver esta questão, porém algumas amostras biológicas como sangue periférico, aspirado de linfonodo ou medula tem apresentado baixa sensibilidade em decorrência da pequena quantidade de DNA extraído. A proposta de utilizar amostra de fácil coleta e indolor como "swab" oral associado à metodologia de qPCR no diagnóstico de LV seria de grande valia para o controle da doença. O referido projeto encontra-se formatado conforme as normas de organização dos trabalhos científicos estabelecido pela portaria 466/2012 da CONEP e suas Complementares.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: O valor do "swab" oral na detecção de LV por *L. (L.) i. chagasi* em indivíduos residentes em área endêmica de LV no Estado do Pará.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N
Bairro: Levidândia **CEP:** 67.030-000
UF: PA **Município:** ANANINDEUA
Telefone: (91)3214-2237 **Fax:** (91)3214-2233 **E-mail:** cep@iec.pa.gov.br

8.2 ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO / TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Projeto: Avaliação do "swab" oral como método de coleta de amostra não invasiva para o diagnóstico molecular de indivíduos suspeitos com leishmaniose visceral por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Estado do Pará

Instituições:_____.

Eu, _____ fui convidado a participar do trabalho que vai estudar "a doença do cachorro" onde eu moro, pois muitas pessoas ficam doentes e outras não, o doutor explicou que a gente tem dentro do corpo coisas que protegem a gente da doença e outras que não protegem. Se ele conseguir saber se na minha boca e no meu sangue tem essas coisas que diz que eu estou doente. O doutor me falou que precisava abrir a boca também para passar um palito com algodão na ponta e disse que ia precisar do meu sangue. Ele me explicou também que não vou sentir nenhuma dor para fazer o exame. Os benefícios esperados dessa pesquisa serão de grande importância para ajudar, a saber, quem está doente e entregar a medicação para que a pessoa seja tratada. Fui também informado que minha participação nesse trabalho é voluntária, que meu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento sem problema algum garantindo meu atendimento pelos agentes de saúde quando precisar, que as informações a respeito de minha identificação serão mantidas em segredo, que os resultados dessa pesquisa poderão ser utilizados em futuras publicações e que o meu sangue e a "baba" da minha boca poderão ser usados em outros estudos. Todas estas informações ficarão sob responsabilidade do Instituto Evandro Chagas. Receberei também uma cópia desse documento que estou assinando e caso eu entenda que durante este trabalho sofri algum dano o doutor explicou que tenho garantia de reparação destes danos previstos em lei e que não exigirá que eu desista de procurar os meus direitos. Em caso de dúvida eu ou qualquer membro da minha família que sabe que eu estou participando do trabalho devemos entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Patrícia Karla Santos Ramos, Fone/Fax: (091) 3214-2019. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rodovia BR 316 Km07, S/N

Bairro Levilândia, Ananindeua/PA, Fone/FAX: (091) 3214-2237 – E-mail:
sac@iec.pa.gov.br

Declaro ter sido informado sobre tudo que está descrito neste documento e concordo em participar desse projeto de pesquisa.

Endereço: _____

Telefone: _____

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha (*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.*)

Analfabetos

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Documento em duas vias

Rubrica em todas as páginas do TCLE/TALE: sujeito de pesquisa ou seu responsável e o pesquisador responsável