**IDENTIFICAÇÃO DE PRIMERS PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Canis Familiaris*; *Felis Catus*; *Homo Sapiens*; *Rattus Sp*. e *Gallus Gallus* EM SANGUE DE REPASTO DE FLEBOTOMÍNEOS: UMA REVISÃO SISTEMATIZADA**

**SOUSA**, Guilherme Soares de[[1]](#footnote-1); **VASSALLO**, Kaline Ribeiro de Almeida[[2]](#footnote-2); **FREITAS**, Gustavo Costa3, **BRINGEL**, Fabiana de Andrade4, **BARBOSA**, Silvia Minharro5

**RESUMO**

A leishmaniose é uma zoonose causada por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada de fêmeas hematófagas de flebotomíneos infectados durante a alimentação em hospedeiros suscetíveis. O conhecimento sobre o comportamento alimentar desses insetos e o papel dos vertebrados na cadeia epidemiológica é crucial para o controle da transmissão. Recentemente, técnicas moleculares como a PCR, com o uso de primers de diferentes níveis de sensibilidade e especificidade, têm sido aplicadas para essa investigação. Este estudo visa identificar e descrever os *primers* mais sensíveis e específicos utilizados na detecção de DNA de vertebrados urbanos envolvidos na transmissão da leishmaniose. A metodologia seguiu uma revisão sistemática conforme o Guia PRISMA. Foram pesquisados estudos transversais nas bases de dados MEDLINE, EMBASE, LILACS, SCOPUS, WEB OF SCIENCE e SCIELO, em inglês e português, utilizando os termos “Phlebotomines”, “Polymerase chain reaction” e “Blood meal”, combinados com os booleanos AND e OR. Os artigos incluídos apresentavam primers usados para identificar o repasto sanguíneo de flebotomíneos e a taxa de sucesso da PCR. Vinte e dois artigos atenderam aos critérios de elegibilidade. A seleção foi realizada de forma independente e pareada, com um índice Kappa de Cohen de 0.634, indicando concordância moderada entre revisores. Conforme o checklist do *Joanna Briggs Institute* (JBI) para estudos transversais, 40,9% (9/22) dos estudos foram considerados de alta qualidade, com baixo risco de viés. O gene citocromo b (cyt b) foi o principal alvo nos estudos (81,82%). Outros genes, como PNOC, COI e 12S, foram relatados em 18,18% dos artigos. A alta taxa de sucesso foi associada ao uso de primers direcionados ao gene cyt b, possivelmente devido à sua eficiência e otimização das condições experimentais. Conclui-se que primers para o gene citocromo b são os mais eficazes na detecção do DNA de vertebrados urbanos na transmissão da leishmaniose.

**Palavras-chave:** Phlebotominae, PCR, Identificação.

1. **INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

O conhecimento do comportamento alimentar dos flebotomíneos nos diversos vertebrados que servem de fonte para a hematofagia é de extrema relevância para o controle eficaz de mosquitos e da transmissão da leishmaniose. Atualmente, essa investigação faz uso, principalmente, da abordagem molecular pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com uso de *primers* com sensibilidade e especificidades variadas. O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura para identificar e descrever os *primers* mais sensíveis e específicos utilizados na detecção de DNA dos vertebrados urbanos envolvidos na transmissão da leishmaniose e as variações das técnicas de PCR usadas para a triagem do repasto sanguíneo nesses hospedeiros.

A área de conhecimento na qual foi desenvolvida esta pesquisa é a Ciências Biológicas e da Saúde, voltada para o estudo do diagnóstico, biologia, epidemiologia e controle de parasitoses e doenças de importância em Medicina e saúde pública.

1. **BASE TEÓRICA**

A transmissão da Leishmaniose ocorre através de flebotomíneos infectados com o parasita e o mecanismo mais relevante é a picada da fêmea hematófaga, que realiza refeições sanguíneas no hospedeiro vertebrado (GONTIJO; MELO, 2004, REY, 2009). Os principais hospedeiros vertebrados variam regionalmente entre animais domésticos e silvestres, incluindo humanos, bovinos, cães e galinhas, que servem como fonte para o repasto. (LAINSON; RANGEL, 2005, SILVA, 2008).

A coexistência de espécies distintas do vetor, reservatórios e parasitas configura um panorama ecológico de alta complexidade que entrava o entendimento acerca da epidemiologia da Leishmaniose, que, por ser um distúrbio de transmissão vetorial, requer a compreensão dos diversos fatores que compõem a ecologia e o comportamento do vetor que transmite o parasito (SRINIVASAN; PANICKER, 1992).

A comparação entre a técnica sorológica ELISA e a análise molecular PCR-RFLP para a identificação do repasto sanguíneo de flebotomíneos mostrou que a sorologia é um método mais demorado e pouco sensível, que requer o ingurgitamento de maior volume sanguíneo do inseto e revela equívocos pela chance de reação cruzada entre as espécies (HAOUAS et al., 2007).

Inversamente, a técnica molecular configura alternativa mais viável em estudos associativos da relação hospedeiro vetor-vertebrado, pois é capaz de analisar componentes de uma única amostra de DNA de múltiplas espécies e identificar várias fontes de repasto, o que permite elucidar o comportamento alimentar e o potencial vetorial dos mosquitos nas áreas endêmicas (MALEKI-RAVASAN et al., 2009).

1. **OBJETIVOS**

 Identificar e descrever os *primers* mais sensíveis e específicos ou a taxa de sucesso para detecção do DNA de vertebrados urbanos envolvidos na transmissão da leishmaniose (*Canis familiaris; Felis catus; Homo sapiens; Rattus sp. e Gallus gallus*) e as variações das técnicas de PCR, descritos em testes de diagnósticos, publicados na literatura científica.

1. **METODOLOGIA**

Este estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura com base nas diretrizes estabelecidas no protocolo PRISMA (PAGE, 2023). As buscas eletrônicas foram de forma pareada e independente realizadas entre abril e junho de 2024, sem restrições ao idioma, país de origem e data, nas bases de dados MEDLINE, EMBASE, LILACS, SCOPUS, WEB OF SCIENCE e SCIELO. A estratégia de pesquisa foi composta por descritores descrevendo a população “Phlebotomines”, o teste utilizado “Polymerase chain reaction” e o desfecho esperado “Blood meal” combinados pelos operadores booleanos OR e AND. Os estudos primários também foram triados de forma pareada e independente entre dois revisores, foram removidos artigos duplicações e avaliados com base nos critérios de elegibilidade previamente definidos a partir da leitura do título e resumo. O índice Kappa de Cohen (1960) foi usado para avaliar a concordância entre os avaliadores.

A extração dos dados dos artigos selecionados foi registrada em um formulário padrão criado no software Excel ®. A análise da qualidade metodológica dos artigos foi realizada para reduzir o viés de informação e de seleção através do “Checklist para estudos analíticos transversais” que faz parte das Ferramentas de Avaliação Crítica para uso em Revisões Sistemáticas do *Joanna Briggs Institute* (JBI). Após a extração dos dados, foi realizada uma síntese qualitativa e narrativa das evidências disponíveis para responder às questões desta revisão. Os dados obtidos sobre os *primers* mais usuais e efetivos foram enquadrados em um teste de frequência relativa e absoluta.

1. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Vinte e dois artigos foram considerados elegíveis e incluídos nesta revisão. O índice Kappa de Cohen (1960) foi de aproximadamente 0.634, o que representa um bom nível de consistência nas decisões de seleção dos artigos pelos revisores. Apenas 40,9% (9/22) dos estudos foram avaliados com qualidade alta e risco de viés baixo. 18,8% (4/22) foram avaliados com baixa qualidade e alto risco de viés. Os demais foram avaliados com qualidade e risco moderados (9/22; 40,9%).

Os vinte e dois estudos incluídos nesta revisão foram publicados entre 2008 a 2023. Os critérios mencionados para realização da amostragem foram: período de estação ativa do mosquito, no geral, do final da tarde ao amanhecer, em diferentes ecótipos (peridomicílio, domicílio e floresta, o relato de casos autóctones de leishmaniose cutânea e próximo aos locais de habitação de animais.

Os *primers* com melhor taxa de sucesso para detecção do DNA de vertebrados urbanos envolvidos na transmissão da leishmaniose foi o gene citocromo b (cyt b), relatados por Dutra-Rêgo, F. et al. (2023; 100% de sucesso), Roy, L. et al. (2023), (98,01% de sucesso) e Remadi, Latifa et al. (2020) (95,48% de sucesso), e o gene citocromo c oxidase I (COI) citado por Bennai, K. et al. (2018) (97,70% de sucesso). Esses quatro estudos utilizaram PCR convencional e os dois primeiros a mesma sequência de oligonucleotídeos.

1. **CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS**

 Para conduzir este estudo, inicialmente projetado para ser uma revisão sistemática de acurácia diagnóstica, as ferramentas precisaram ser adaptadas e ajustadas de acordo com o perfil e a metodologia aplicada nos estudos primários incluídos, que não apresentaram caráter experimental, mas sim transversal.

 O gene do citocromo b (cyt b) foi o principal gene-alvo utilizado nos estudos avaliados (81,82%). A maioria dos *primers* para o citocromo b foram variantes de sequências básicas semelhantes. Outros genes, como o PNOC, COI, e 12S também foram relatados (18,18%). Em que a técnica da PCR foi a convencional foi a mais citada nos trabalhos envolvidos.

1. **REFERÊNCIAS**

BENNAI, K. et al. Molecular detection of Leishmania infantum DNA and host blood meal identification in Phlebotomus in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006513, 2018.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

DUTRA-RÊGO, F. et al. Molecular detection of Leishmania and blood meal analysis in sand flies from Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta tropica**, v. 245, n. 106961, p. 106961, 2023.

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.

HAOUAS, Najoua et al.. Desenvolvimento de ferramenta molecular para identificação de hospedeiros reservatórios de Leishmania por meio de análise de repasto sanguíneo em insetos vetores. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 1054-1059, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F.. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005.

MALEKI-RAVASAN, N. et al. Identificação de farinha de sangue em flebotomíneos capturados em campo: comparação de ensaios PCR-RFLP e ELISA. **Jornal iraniano de doenças transmitidas por artrópodes**, v. 1, p. 8, 2009.

PAGE, M. J. et al. A declaração PRISMA 2020: diretriz atualizada para revisões sistemáticas. **Revista panamericana de salud publica**, v. 46, p. e112, 2023.

REMADI, L. et al. Molecular detection and identification of Leishmania DNA and blood meal analysis in Phlebotomus (Larroussius) species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008077, 2020.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

ROY, L. et al. The ongoing risk of Leishmania donovani transmission in eastern Nepal: an entomological investigation during the elimination era. **Parasites & vectors**, v. 16, n. 1, 2023.

SRINIVASAN, R.; PANICKER, K. N. Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 23, n. 3, p. 486–488, 1992

1. **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

1. Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFT). guilherme.soares@ufnt.edu.br. [↑](#footnote-ref-1)
2. Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFT). kaline.vassallo@ufnt.edu.br.

3 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFT). gustavo.freitas@ufnt.edu.br.

4 Professora Doutora da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), coorientadora do projeto de pesquisa. fabiana.bringel@ufnt.edu.br

5 Professora Doutora da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), orientadora do projeto de pesquisa. silvia.barbosa@ufnt.edu.br. [↑](#footnote-ref-2)