

RELATÓRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO FINAL

Detecção de infecção por *Leishmania* spp. em flebotomíneos
coletados na cidade de Florianópolis (Santa Catarina)

Demanda solicitada pela CGLAB (2010)

Coordenador - Edelberto Santos Dias
Colaboradores – Érika Michalsky Monteiro
Josiane Valadão Lopes
Eduardo de Castro Ferreira

Laboratório de Leishmanioses
Centro de Referência em Competência Vetorial de Flebotomíneos
Centro de Pesquisa René Rachou - Fundação Osvaldo Cruz
Belo Horizonte, Minas Gerais
Brasil

Março de 2011

1. Introdução

O estado de Santa Catarina é considerado, segundo classificação do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, área sem transmissão, vulnerável, porém não receptiva para a doença. Entretanto, em julho de 2010, a Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina (SES/SC) notificou ao Ministério da Saúde o registro de quatro casos suspeitos de leishmaniose visceral canina. Em estudo realizado pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas/Fiocruz ficou comprovado o encontro da espécie *Leishmania chagasi* em dois dos quatro animais suspeitos.

Tendo em vista que, até o momento, não foi encontrada em Florianópolis a espécie do vetor *Lutzomyia longipalpis* envolvida no ciclo de transmissão dessa zoonose, a SES local realizou capturas entomológicas em diversas áreas da referida cidade, visando obter amostras das espécies de flebotomíneos presentes. O material entomológico coletado foi encaminhado para o nosso Centro de Referência, com o objetivo de esclarecer a espécie de flebotomíneo possivelmente envolvida no ciclo de transmissão, naquela cidade.

2. Objetivos

- Identificar as espécies de flebotomíneos presentes através de técnicas de taxonomia clássica
- Identificar possíveis flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp., através de técnicas moleculares (“Nested PCR” para SSUrRNA)
- Caracterizar a(s) espécie(s) de *Leishmania* nos possíveis flebotomíneos infectados através da técnica de sequenciamento de DNA.

3. Metodologia

Procedência do material entomológico e classificação adotada

O material entomológico foi proveniente das atividades de vigilância entomológica em sete pontos de captura (denominados 1 a 7) em Florianópolis, pela equipe do Laboratório de Entomologia da Secretaria Estadual de Saúde. As fêmeas de flebotomíneos capturadas foram identificadas através de exames morfológicos e a classificação adotada foi à proposta por Young e Duncan (1994).

Extração de DNA total das fêmeas de flebotomíneos capturadas

As fêmeas de flebotomíneos foram dissecadas para a confirmação da espécie e, posteriormente, agrupadas em “pools” de no máximo 10 indivíduos para extração de DNA total. A extração foi realizada através de kit de extração de tecido e células (GE HealthCare) e os DNAs extraídos foram armazenados a -20° C até a realização de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

*Detecção da taxa de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* spp.*

As amostras de DNA extraídas dos “pools” de flebotomíneos foram analisadas através da técnica “Nested PCR” (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento conservado em todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys et al., 1992; Cruz et al., 2002 e 2006).

Inicialmente foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 603pb, utilizando-se os iniciadores R1 (5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3') e R2 (5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3'), seguida de amplificação de um fragmento de aproximadamente 353pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, utilizando-se os iniciadores R3 (5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3') e R4 (5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'), como mostrado na Figura 1.

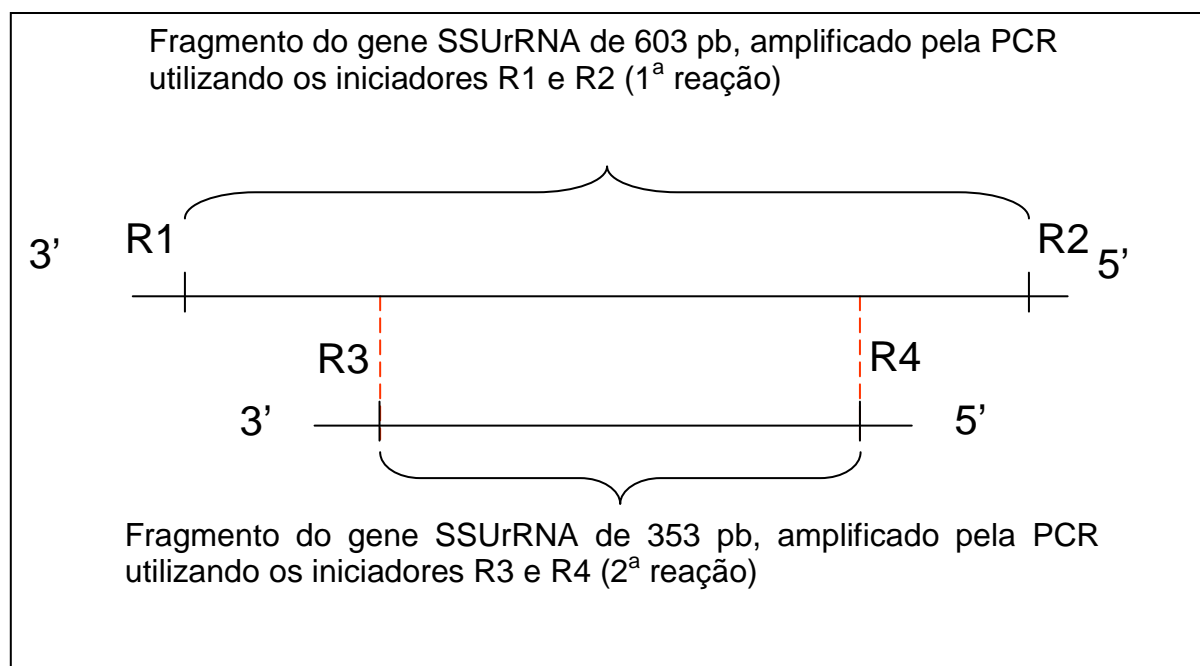


Figura 1. Desenho esquemático do resultado da LnPcr destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 25 μ l contendo 10 μ l de DNA da amostra a ser testada. Em tubos contendo 1 ml de H₂O foram diluídos 25 μ l de produto da primeira reação, para serem utilizados como molde na segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 μ l contendo 10 μ l do produto amplificado diluído. As duas reações foram preparadas utilizando o kit PCR Beads (GE Healthcare).

A amplificação foi processada em termociclador automático, da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, para a primeira reação. Na segunda reação a temperatura de anelamento foi elevada para 65°C, mantendo-se as outras condições. A etapa de extensão final foi feita a 72°C por cinco minutos, para ambas as reações.

Em todas as reações foram utilizadas 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. chagasi* = *L. infantum*, como controle positivo. Como controle negativo (sem DNA) a amostra de DNA foi substituída por volume equivalente de H₂O destilada estéril.

Análise dos produtos amplificados pela PCR

Os produtos amplificados na etapa anterior foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e examinado em exposição à luz ultravioleta (UV).

Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania

Para a identificação das espécies de *Leishmania* infectantes no vetor foi realizado o seqüenciamento do produto de aproximadamente 353pb, amplificado na segunda reação da LnPCR. Para isso, todas as bandas correspondentes, com intensidade considerável, foram extraídas do gel e purificadas utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O produto purificado foi eluído em 20 µl de H₂O destilada estéril e utilizado como molde para amplificação anterior ao processo de seqüenciamento.

A reação de PCR para o seqüenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formados por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador R3 e R4 na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto purificado na etapa anterior. A mistura foi amplificada em um termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient® com o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 25 ciclos de 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos e 60°C por quatro minutos. O seqüenciamento propriamente dito foi realizado, posteriormente, em seqüenciador automatizado Megabace.

A análise bioinformática (edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição) das seqüências obtidas foi realizada utilizando-se os programas computacionais DNASTAR (Lasergene® sequence analysis) e BIOEDIT. As sequencias editadas foram alinhadas com sequencias depositadas no GenBank para *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

4. Resultados obtidos

Estudos entomológicos

Nos sete pontos do município de Florianópolis, foram coletados 658 espécimens de flebotomíneos, distribuídos nas seguintes espécies: *Lutzomyia fischeri*, *L. migonei*, *L. edwardsi*, *L. tupynambai*, *L. firmatoi* e *L. neivai*. Após a identificação específica, foram preparados 136 “pools” contemplando todas as espécies. Cada “pool” foi composto por número variável de espécimens entre 1 e 9. A **Tabela 1** lista o número de “pools” por espécie e por ponto de captura.

Tabela 1. Número de “pools” por espécie de flebotomíneo e por ponto de captura em Florianópolis, Santa Catarina, em 2010.

Espécie de flebotomíneo	Ponto de captura							1 a 7
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Lutzomyia fischeri</i>	3	9	3	41	3	1	6	66
<i>L. neivai</i>	4	1	2	12	2	1	3	25
<i>L. migonei</i>	4	7	1	15	3	1	3	34
<i>L. edwardsi</i>	1	0	0	2	0	0	3	6
<i>L. tupynambai</i>	1	0	0	1	0	0	2	4
<i>L. firmatoi</i>	0	0	0	1	0	0	0	1
Total	13	17	6	72	8	3	17	136

Deteção da infecção natural de flebotomíneos por Leishmania spp.

Dos 136 “pools” de flebotomíneos, 9 deles apresentaram-se positivos para *Leishmania* sp. (**Figura 1**). Os “pools” positivos estão identificados na **Tabela 2**.

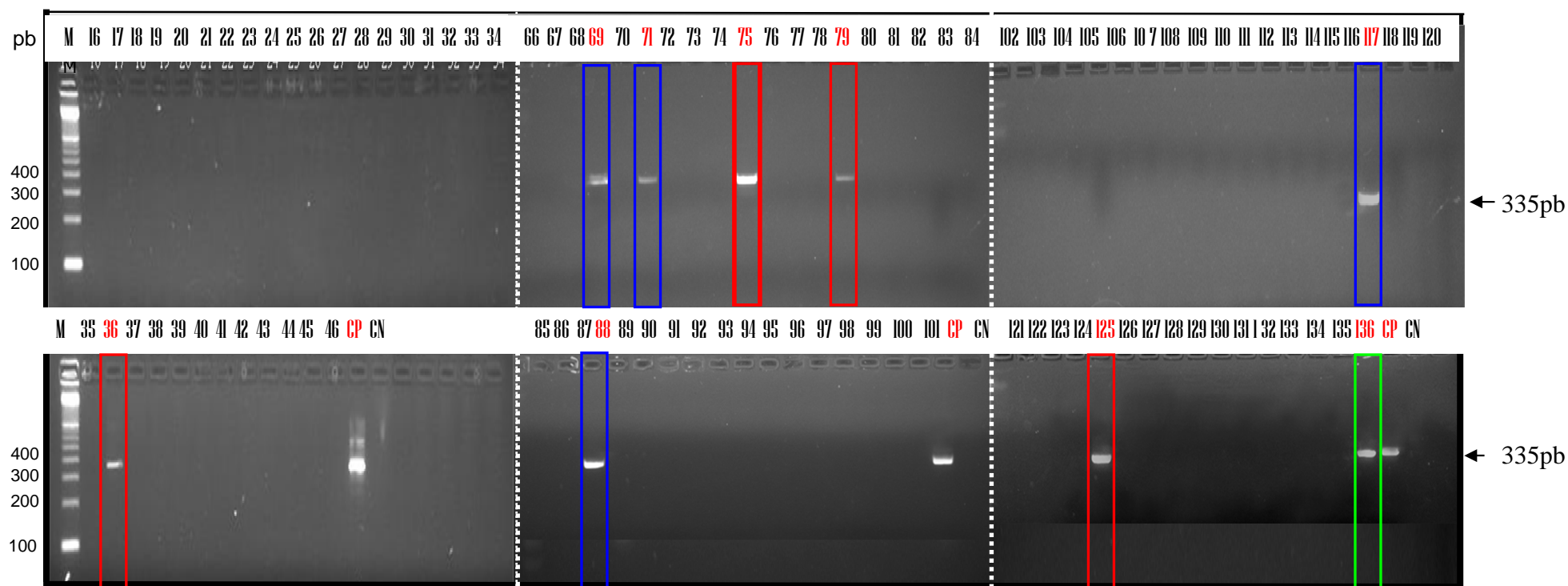


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA (flebotomíneos) obtidos com iniciadores para um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídio. Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; **16 a 136**- DNA total de “pools” de flebotomíneos capturados em Florianópolis; **CP**- Controle Positivo da Reação (*L. chagasi*); **CN**- Controle negativo da reação (sem DNA). Amostras positivas para o fragmento de 335pb, característico do gênero *Leishmania* estão identificadas em vermelho. Legenda de contornos das canaletas positivas: *L. fisheri* - azul, *L. neivai* - vermelho, *L. migonei* - verde. Nas amostras 1 a 15 e 47 a 65 não ocorreu amplificação (gel não mostrado).

Tabela 2- “Pools” de flebotomíneos positivos para DNA genérico para *Leishmania* spp. de acordo com espécie, número de espécimens no “pool” e ponto de captura em Florianópolis, Santa Catarina.

"Pool" no.	Espécie de flebotomíneo	No. espécimens no "pool"	Ponto de captura
36	<i>L. neivai</i>	2	5
69	<i>L. fischeri</i>	10	7
71	<i>L. fischeri</i>	10	7
75	<i>L. neivai</i>	6	7
79	<i>L. neivai</i>	2	7
88	<i>L. fischeri</i>	2	4
117	<i>L. fischeri</i>	8	4
125	<i>L. neivai</i>	3	1
136	<i>L. migonei</i>	1	4

Sequenciamento SSURNA para determinação da espécie de *Leishmania*

Os “pools” positivos foram submetidos ao seqüenciamento de DNA para determinação da espécie de *Leishmania*. Dos 9 “pools” contendo DNA em nível genérico para *Leishmania* spp., foi possível determinar a espécie de *Leishmania*, através de sequenciamento de DNA, somente em um (número 125 - *Lutzomyia neivai*). O alinhamento da sequencia obtida com aquelas depositadas no GenBank permitiu a identificação de *Leishmania chagasi* como espécie infectante (**Figura 2**).

Justifica-se a não identificação da espécie de parasito infectante para os outros “pools” positivos (36, 69, 71, 75, 79, 88, 117 e 136) para DNA genérico de *Leishmania* como sendo problemas inerentes às técnicas de extração de DNA do gel de agarose ou de sequenciamento de DNA, possivelmente devido à reagentes com problemas, baixa carga parasitária de *Leishmania* nos flebotomíneos ou baixa concentração de DNA após a purificação da amostra extraída do gel.


```

L_braziliensis(M80292) TCCATCGCAACTTCGGITCGGIGTGGCGCCCTTTGGAGGGTTTAGTIG
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....C.....-.....
MS amostra 125 .....C.....-.....

L_braziliensis(M80292) GTCCCGGTGCGCGCTCCGGTTTCGTCGCGCGTAACGCCCTTTTCAACTCAC
L_amazonensis(M80293) .....A.....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....A.A.....
MS amostra 125 .....A.A.....

L_braziliensis(M80292) GGCTCTTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGAGAACGTAICTGGGGCGT
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

L_braziliensis(M80292) CACAGGTCGAANTTCITTAGACCGCACCAAGACCAACTACAGCCGAGGCATT
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

L_braziliensis(M80292) CTTCAGGATACCTTCCCAATCAAGAACCAGGAGTGGGATCGAAGAT
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

L_braziliensis(M80292) GATTAGAGACCAATTGTAGTCCACACTGCAAAACGATGACACCCATGAATTG
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

L_braziliensis(M80292) GCGATCTTATGGCGCGCCCTGCGGCAGGGTTTACCTGTGTCAGACCCG
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

L_braziliensis(M80292) GCGCCGCTTT
L_amazonensis(M80293) .....
L_chagasi (M81430)R3R4 .....
MS amostra 125 .....

```

Figura 2. Alinhamento de sequências de nucleotídeos (nt) da amostra 125 após “Nested-PCR” para o gene SSUrRNA de *Leishmania* e sequências depositadas no GENBANK para *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os pontos e o hífen representam nt idênticos nas sequências alinhadas e deleção, respectivamente.

5. Conclusão

O presente resultado representa o segundo registro de *Lutzomyia neivai* infectado por *Leishmania chagasi*=*Leishmania infantum*. Em trabalho realizado por Saraiva et al. (2009) no município de Lassance (MG) já havia sido verificada infecção natural de *Lutzomyia neivai* por *Leishmania infantum chagasi* em isolados do parasita e caracterizados pela técnica de RFLP. Outros trabalhos têm demonstrado o envolvimento desta espécie na transmissão de *Leishmania (Viannia)* spp. no estado

do Paraná (Oliveira et al.,2011) e em Santa Catarina (Marcondes et al., 2009), respectivamente.

O conjunto de dados sugere a participação de *L. neivai* no ciclo de transmissão da LV canina por *L. chagasi*, em Florianópolis. Entretanto, eles são ainda insuficientes para incriminá-la, de forma definitiva, como vetor de leishmaniose, uma vez que, de acordo com Killick-Kendrick (1990), para essa incriminação o flebotomíneo deve: (1) se alimentar em humanos e, se a doença for zoonótica, no reservatório animal; (2) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (3) possuir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes e; (4) ser capaz de transmitir o parasito pela picada. Com exceção do primeiro requisito, para o qual já existem evidências na literatura (Saraiva et al., 2009), os outros aguardam verificação.

6. Referências

- Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, Legriffon CMD, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (viannia)* spp. in the state of Paraná, Southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* (11): 137-143, 2011.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*1990; 4:1-24.
- Saraiva L., Mayr G.L., Gontijo, C.M., Quaresma, P. F., Lima, A.C.M.R. falcão, A.L. Andrade Filho, JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Díptera:Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J. Med. Entomol. Entomol.* 46(5): 1159-1163, 2009.
- Marcondes, C.B., Bittencourt, I.A., Stoco, P.H., Eger I, Grisard, E.C., Steindel, M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. In Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical medicine and Hygiene.* 103, 1093-1097.

Young DG; Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54: 1-881, 1994.

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 133-142.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in co-infected patients with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (1): 185-189.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2343-2347.

Edelberto Santos Dias

Chefe do Laboratório de Leishmanioses/CPqRR/Fiocruz

Coordenador do Centro de Referência em competência vetorial de flebotomíneos