

**RELATÓRIO TÉCNICO - CIENTÍFICO**  
**(Parcial)**

**Demanda solicitada pela CGLAB:**

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

**Laboratório de Leishmanioses**  
**Centro de Referência em Competência Vetorial de Flebotomíneos**  
**Coordenador - Edelberto Santos Dias**

**BELO HORIZONTE**  
**MINAS GERAIS-BRASIL**  
**Dezembro de 2010**

## 1. Introdução

O estado de Santa Catarina é considerado, segundo classificação do Manual de Vigilância e Controle da LV do Ministério da Saúde, área sem transmissão, vulnerável, porém não receptiva.

Em julho do presente ano, a Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina (SES/SC) notificou ao Ministério da Saúde (MS) 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 a espécie do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) envolvida no ciclo de transmissão desta zoonose em Florianópolis, a (SES/SC) realizou capturas entomológicas em diversas localidades da referida cidade, visando obter amostras das espécies de flebotomíneos locais. O material entomológico coletado foi encaminhado para o nosso Centro de Referência, objetivando esclarecer qual a possível espécie de flebotomíneo envolvida neste ciclo de transmissão.

## 2. Objetivos

Identificar as espécies de flebotomíneos recebidas através da taxonomia clássica.

Identificar através da técnica de PCR os possíveis flebotomíneos infectados.

Caracterizar a espécie de *Leishmania* encontrada através da técnica (*SSU/rRNA*).

## 3. Metodologia

### ***Procedência do material entomológico e classificação adotada***

O material entomológico foi proveniente das atividades de vigilância entomológica, que vêm sendo realizada no estado por meio 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 a proposta por Young e Duncan (1994).

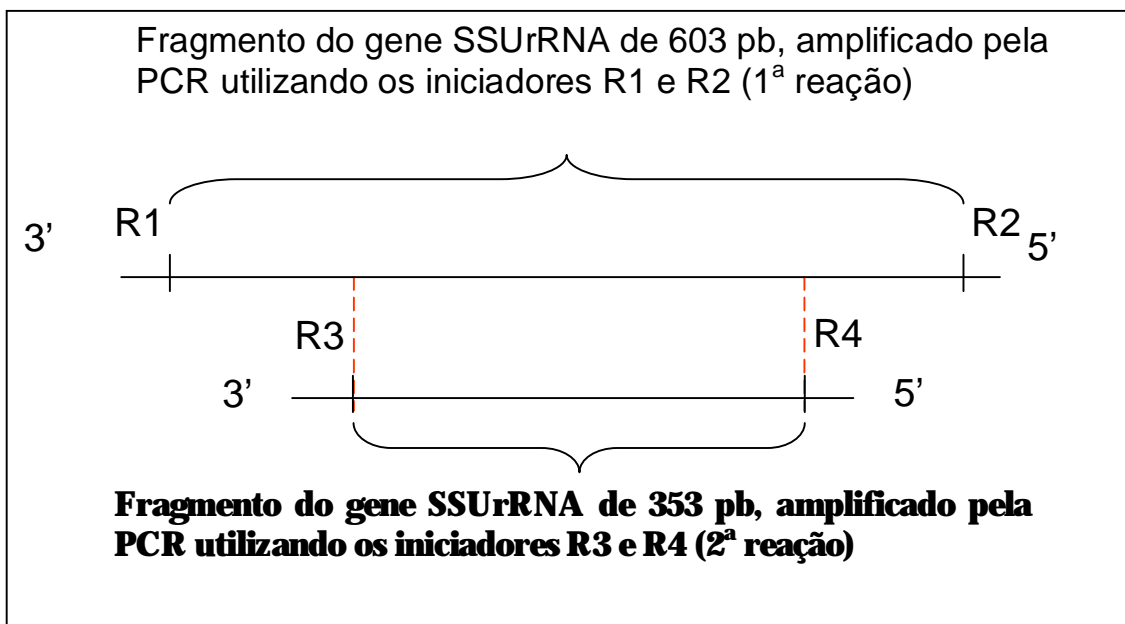
### ***Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas***

As fêmeas foram dissecadas para a confirmação da espécie, agrupadas em “pools” de no máximo 10 indivíduos e colocadas em microtubos de fundo cônico, para extração de DNA. A extração foi realizada através do Kit de Extração de Tecido e células da GE Amersham Biosciences e armazenados a  $-20^{\circ}$  C para realização da PCR.

### ***Deteção da infecção natural dos flebotomíneos por Leishmania spp.***

Para determinar a taxa de infecção natural, as amostras de DNA extraídas dos “pools” dos flebotomíneos foram analisadas através da técnica Nested PCR (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento deste gene que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys et al., 1992; Cruz et al., 2002 e 2006).

Para a amplificação das amostras foi realizada uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, 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 da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, 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 demonstrado na figura abaixo:



**Figura:** Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl de DNA da amostra a ser testada.

Em tubos contendo 1 ml de H<sub>2</sub>O foram diluídos 25 µl de produto da primeira reação, para serem utilizados como ‘template’ da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl do produto amplificado diluído. As duas reações foram preparadas utilizando o Kit de PCR Beads (GE Healthcare).

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições 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 e desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por cinco minutos para ambas as reações.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. infantum*, e como controle negativo foi utilizado H<sub>2</sub>O destilada estéril como ‘template’.

#### ***Análise dos produtos amplificados pela PCR***

Os produtos amplificados pelas PCRs utilizando iniciadores que amplificam fragmentos do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia) e do gene SSUrRNA foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV).

#### ***Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania***

Para a identificação das espécies de *Leishmania* será realizado o seqüenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353pb).

Todas as bandas de 353 pb com intensidade considerável serão cortadas e purificadas utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado e purificado,

eluído em 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada e estéril será utilizado como template para uma amplificação, anterior ao processo de seqüenciamento.

A reação de PCR para o seqüenciamento será preparada para um volume final de 10 µl, formada por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto de PCR. Este mix será colocado em um termociclador (AB9800®) com o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 25 ciclos de: 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos (esta temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60°C por quatro minutos. O seqüenciamento propriamente dito será posteriormente realizado em seqüenciador automatizado.

A análise bioinformática das seqüências obtidas será realizada utilizando-se os programas Lasergene® sequence analysis software (DNASTAR) e o BIOEDIT. Estas análises incluem a edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição das seqüências estudadas.

O alinhamento das seqüências editadas com aquelas depositadas no GenBank permitirá a identificação de três espécies de interesse na área de estudo; *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

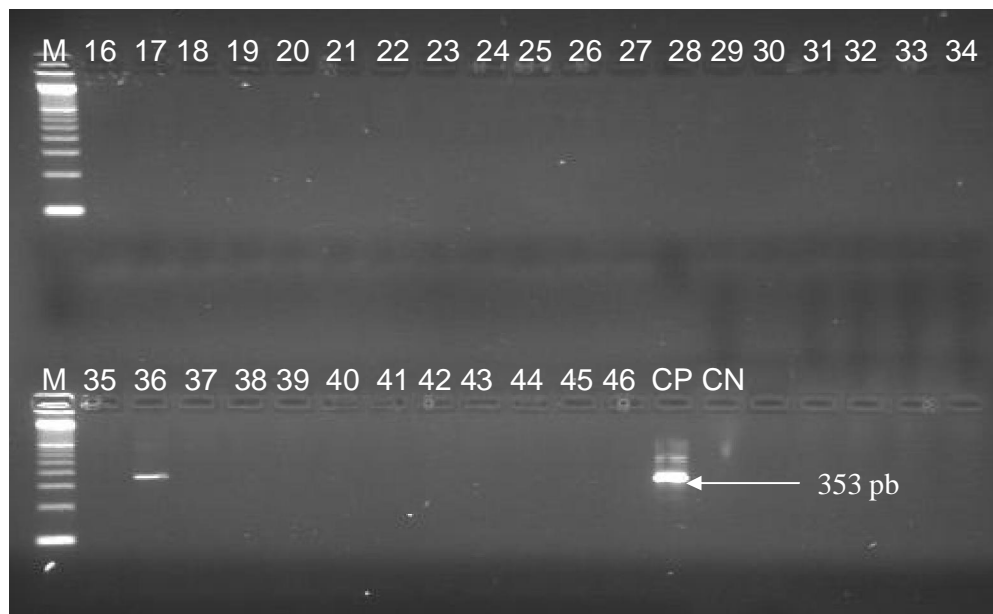
#### **4. Resultados obtidos**

No município de Florianópolis foram coletados 413 espécimens fêmeas de flebotomíneos distribuídos nas seguintes espécies: *Brumptomyia* sp. *Lutzomyia fischeri*, *L. migonei* e *L. neivai*. Após a identificação foram preparados 65 pools para extração de DNA. O espécimen de *Brumptomyia* sp. Não foi analisado por não apresentar importância médica.

Espécies (Pools) Locais de captura	2	3	4	5	Total
<i>Lutzomyia fischeri</i>	5	3	28	3	<b>39</b>
<i>L. migonei</i>	3	1	9	3	<b>16</b>
<i>L. neivai</i>	0	2	6	2	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>43</b>	<b>8</b>	<b>65</b>

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

O estudo teve como objetivo determinar a infecção natural por *Leishmania* spp. através da técnica de PCR SSUrRNA. Dos 65 “pools” de flebotomíneos capturados, 1 “pool” (Ponto 5), espécie *L. neivai* apresentou-se positivo para *Leishmania* spp. (Figura 1). A amostra positiva no SSUrRNA será submetida ao seqüenciamento para determinação da espécie de *Leishmania*.



OBS: O seqüenciamento da amostra positiva, para caracterização da espécie de *Leishmania* está em fase de processamento e será entregue somente na primeira quinzena de janeiro, devido à alta demanda da Plataforma de Seqüenciamento do Centro de Pesquisas René Rachou e ao período de festas do final de ano. Neste mesmo período, será fornecido o resultado do segundo lote de flebotomíneos encaminhados pela Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina.

Edelberto Santos Dias

Chefe do Laboratório de Leishmanioses/CPqRR/Fiocruz

Coordenador do Centro de Referência em competência vetorial de flebotomíneos