



## Artigo/Article

# Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil

Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil

Nanci Akemi Missawa<sup>1</sup>, Márcia Aurélia Esser Veloso<sup>1</sup>, Giovana Belem Moreira Lima Maciel<sup>1</sup>, Érika Monteiro Michalsky<sup>2</sup> e Edelberto Santos Dias<sup>2</sup>

### RESUMO

**Introdução:** O município de Jaciara foi classificado em 2003, como área de transmissão de leishmaniose visceral em situação de surto. O trabalho objetivou determinar evidência de transmissão de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Métodos:** O município situa-se a 127km da capital Cuiabá e é um importante ponto de atração para os praticantes de eco-turismo. Fêmeas de *Lutzomyia cruzi*, capturadas com armadilha de CDC, foram dissecadas para confirmação da espécie e armazenadas a -20°C em pools de 10 indivíduos para extração de DNA, PCR genérico, RFLP específico e eletroforese em gel de poli-acrilamida. **Resultados:** O levantamento entomológico demonstrou a ocorrência abundante de *Lutzomyia cruzi* e ausência de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetora da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Uma das três amostras analisadas apresentou banda característica de DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (120pb) em PCR genérico. Para confirmação da espécie de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, na RFLP utilizaram-se controles positivos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* digeridas com enzima de restrição HaeIII. Constatou-se um padrão de bandas semelhante à *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em uma amostra, confirmando a detecção de infecção natural de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em *Lutzomyia cruzi*. **Conclusões:** A ocorrência de casos humanos e cães positivos, a presença da *Lutzomyia cruzi* e a ausência de *Lutzomyia longipalpis*, bem como a detecção de infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, evidenciam a participação de *Lutzomyia cruzi* na transmissão da leishmaniose visceral em Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil.

**Palavras-chaves:** *Lutzomyia cruzi*. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Infecção natural. Mato Grosso.

### ABSTRACT

**Introduction:** The municipality of Jaciara was classified in 2003 as a transmission area for visceral leishmaniasis in outbreak situations. This study aimed to establish evidence of transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Methods:** This municipality is located 127 km from the state capital (Cuiabá) and is an important center for ecotourism practitioners. Females of *Lutzomyia cruzi*, captured using CDC traps, were dissected to confirm the species and stored at -20°C in pools of 10 individuals for DNA extraction, generic PCR, specific RFLP and electrophoresis on polyacrylamide gel. **Results:** The entomological survey showed abundant occurrence of *Lutzomyia cruzi* and absence of *Lutzomyia longipalpis* (the main vector for *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*). One of the three samples showed a characteristic DNA band from *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (120 bp) in generic PCR. To confirm the *Leishmania* species via RFLP, positive controls for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* digested with restriction enzyme HaeIII were used. A pattern of bands similar to *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* was found in one sample, thus confirming the detection of natural infection with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in *Lutzomyia cruzi*. **Conclusions:** The occurrences of positive cases in humans and dogs, the presence of *Lutzomyia cruzi* and the absence of *Lutzomyia longipalpis* together with the detection of natural infection with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, indicate that *Lutzomyia cruzi* participates in visceral leishmaniasis transmission in Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil.

**Keywords:** *Lutzomyia cruzi*. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Natural infection. Mato Grosso.

1. Laboratório de Entomologia, Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, Cuiabá, MT. 2. Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG.

**Endereço para correspondência:** Dra. Nanci Akemi Missawa. Lab. Entomol/SES/MT. Av. Adauto Botelho s/nº, Parque da Saúde, Bairro CoopHEMA, 78085-200 Cuiabá, MT.

Tel: 55 65 3661-2934

e-mail: nanci.am@terra.com.br

Recebido para publicação em 28/06/2010

Aceito em 06/10/2010

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) que era inicialmente uma doença rural passou a acometer áreas urbanas de pequeno e médio porte e, atualmente, ocorre em grandes centros urbanos, revelando o processo de periurbanização e urbanização da doença.

No ano de 2003, o município de Jaciara/MT foi definido como área de transmissão de LV em situação de surto, segundo o Manual de Vigilância e Controle da LV<sup>1</sup>, pois apresentou transmissão, com número de casos superior ao esperado.

Tendo em vista a situação apresentada no município, a Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso (SES/MT) realizou um levantamento entomológico para verificar a presença do vetor no local, e as pesquisas corroboraram com resultados de Missawa e Lima<sup>2</sup> que detectaram apenas *Lutzomyia cruzi* como potencial vetora da LV no município, indicando ser o cerrado, o ambiente preferencial da espécie. Foi registrada a ocorrência de *L. cruzi* e a ausência de *L. longipalpis*, considerado como principal vetor do agente da LV, no Brasil<sup>3</sup>.

A espécie *L. cruzi* foi incriminada como vetora da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em Mato Grosso do Sul, pois na região de Corumbá e Ladário não ocorria *L. longipalpis* no período estudado, aliado ao fato de que o flebotomíneo foi encontrado com infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*<sup>4,5</sup>. Novos conhecimentos sobre a ecologia de *L. cruzi* e sua eventual infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* em outras regiões trariam informações sobre a importância da espécie como transmissora de LV.

### MÉTODOS

O município de Jaciara/MT situa-se a 127km da capital Cuiabá, possui 23.804 habitantes<sup>6</sup>, extensão territorial de 1.801,41km<sup>2</sup>, apresenta solo podzólico vermelho amarelo e clima tropical quente e semi-úmido, com quatro meses de seca, de maio a agosto. A precipitação anual é de 1.750mm, com intensidade máxima em dezembro, janeiro e fevereiro.

A temperatura média anual é de 22°C, sendo maior máxima de 40°C, e a menor 0°C<sup>6</sup>. Além do desenvolvimento econômico ligado à agricultura, o município propicia atividades de eco-turismo e lazer.

Foram utilizados dados entomológicos secundários disponibilizados pelo Laboratório de Entomologia da SES/MT, obtidos de levantamentos pontuais realizados em novembro de 2003, janeiro, agosto e setembro de 2004 e do monitoramento de flebotomíneos realizado no período de abril de 2005 a junho de 2006. As coletas de flebotomíneos foram realizadas no peridomicílio de residências com notificação de caso humano e/ou canino de LV. Foram utilizadas armadilhas de luz do tipo CDC instaladas no entardecer e recolhidas cerca de 12h após, durante o amanhecer. Os espécimes foram triados, clarificados e identificados segundo a chave de identificação de Young e Duncan<sup>10</sup>, e estão depositados no Laboratório de Entomologia da SES/MT.

Fêmeas de *L. cruzi* foram dissecadas para confirmação da espécie e armazenadas à -20°C em três *pools* de 10 indivíduos para posterior análise molecular para detecção de DNA de *Leishmania* spp. O DNA foi extraído por maceração em microtubo, utilizando-se pistilo de plástico, seguido pela adição de 35µl de tampão de lise (100mM TRIS-HCl, 100mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) seguido de outra maceração. As amostras foram digeridas durante a noite a 37°C com proteinase K (1,25µl de solução 10mg/ml) e o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio<sup>7</sup>. O pellet de DNA foi ressuscitado em 20µl de TE (10mM TRIS-HCl pH 8,0, 1mM EDTA). Utilizou-se 10µl para estimar a pureza e a concentração em espectrofotômetro a 260 e 280nm. As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer a -20°C, até o momento do uso.

O DNA extraído foi amplificado por procedimento *hot start* PCR em um termociclador. A mistura de reação foi preparada com 10µl de tampão de PCR (100mM TRIS-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0), 5µl dNTPs (2mM cada), 2µl de cada iniciador (200ng/µl), 0,5µl de Taq DNA polimerase (2,5U/µl) e 26,5µl de água ultra pura. Adicionou-se 2µl de DNA (10ng/µl) por reação e a amplificação do DNA foi realizada para *Leishmania* sp, utilizando-se os iniciadores<sup>7</sup>: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'; 5'CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; 5'GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'. Os ciclos de amplificação consistiram em um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 50°C por 30s; extensão a 72°C por 30s e uma extensão final a 72°C por 10min<sup>8</sup>. Controles negativos e positivos foram utilizados em todos os experimentos. Para a detecção do DNA da *Leishmania* sp foi utilizado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)<sup>9</sup>.

As amostras positivas no PCR genérico foram submetidas à reação de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). As amostras referência de *Leishmania* utilizadas foram *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930) e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida na concentração de 10%.

## RESULTADOS

Foram identificados 3.110 espécimes, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Brumptomyia*: *Lutzomyia acantopharynx*, *L. antunesi*, *L. carmelinoi*, *L. carrerai carrerai*, *L. cruzi*, *L. dasymera*, *L. davis*, *L. evandroi*, *L. hermanlenti*, *L. lenti*, *L. longipennis*, *L. punctigeniculata*, *L. sallesi*, *L. sordellii*, *L. teratodes*, *L. termitophila* e *L. whitmani* e *B. brumpti*.

*L. whitmani* (66,5%) e *L. cruzi* (28,6%) foram as mais abundantes coletadas no município, com predominância de machos em ambas as espécies. As espécies foram capturadas em todos os meses pesquisados. Não foram capturados espécimes de *L. longipalpis* no município.

A detecção da *Leishmania* sp em *L. cruzi* foi realizada utilizando-se marcador de 100 pares de base (Ladder) e controle positivo. Observou-se que a amostra 3 apresentou banda característica de DNA de *Leishmania* (120pb) conforme demonstrado na **Figura 1**.

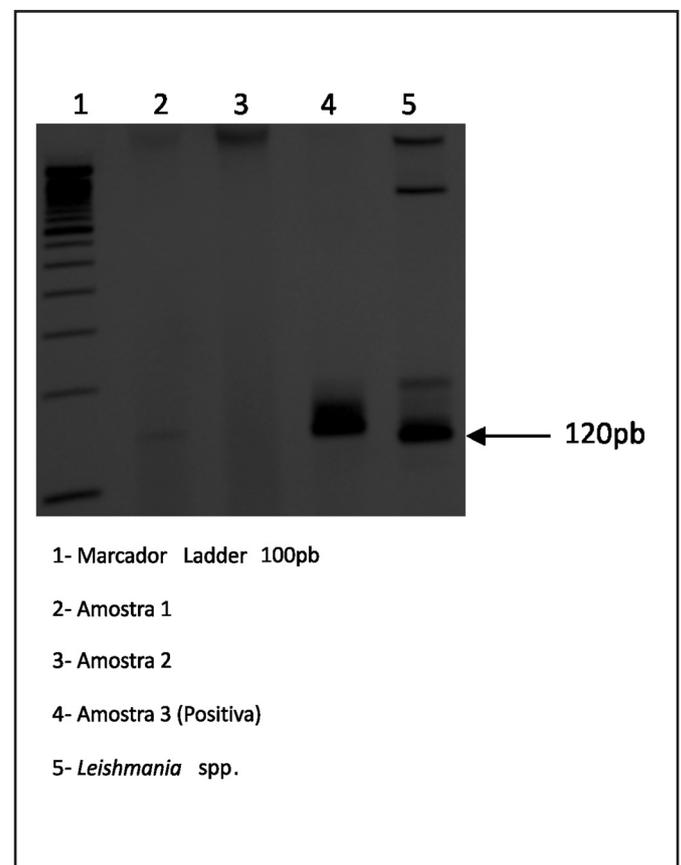


FIGURA 1 - Detecção de *Leishmania* spp em *Lutzomyia cruzi* naturalmente infectado.

Para confirmação da espécie de *Leishmania*, na RFLP, utilizou-se controles positivos de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* digeridas com enzima de restrição HaeIII. Constatou-se um padrão de bandas semelhante a *L. (L.) infantum chagasi* na amostra 3 (**Figura 2**), confirmando a detecção de infecção natural em *L. cruzi*.

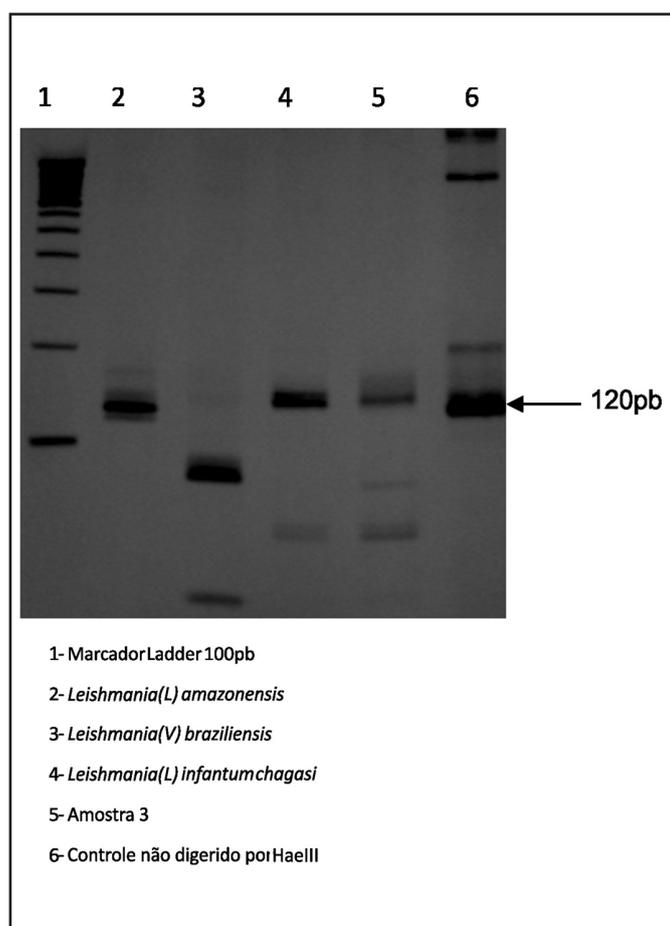


FIGURA 2 - Detecção de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em *Lutzomyia cruzi* naturalmente infectado.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos técnicos da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso pelos trabalhos entomológicos, imprescindíveis à realização deste trabalho.

### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

### SUPORTE FINANCEIRO

Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso (SES/MT), Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2003.
2. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39:337-340.
3. Lainson R, Rangel EF. Ecologia das Leishmanioses. In: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p.291-309.
4. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RU, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998; 12:315-317.
5. Marcondes CB. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Editora Atheneu; 2001.
6. Ferreira JCV. Mato Grosso e seus Municípios. Cuiabá: Editora Buriti; 2001.
7. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* sp. em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44:255-259.
8. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica 1992; 52:45-58.
9. Pinheiro NA, Moura RP, Monteiro E, Villa LL. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. Braz J Med Biol Res 1999; 32:55-58.
10. Young D, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Florida: Associated Publishers American Entomological Institute; 1994.
11. Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:42-48.
12. Chagas AC, Medeiros JF, Justiniano SCB, Pessoa FAC. Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. Acta Amazonica 2007; 37:127-132.

### DISCUSSÃO

A distribuição de *L. cruzi* seria restrita ao Estado de Mato Grosso do Sul<sup>10</sup>, mas pesquisas entomológicas realizadas no Estado de Mato Grosso, indicam a presença desse vetor nos municípios de Alto Araguaia, Barão de Melgaço, Barra do Garças, Canarana, Chapada dos Guimarães, Cuiabá, Dom Aquino, Feliz Natal, Itiquira, Jaciara, Juína, Mirassol d'Oeste, Nobres, Nova Brasilândia, Nova Canaã do Norte, Paranatinga, Poconé, Pontal do Araguaia, Poxoréo, Primavera do Leste, Rondonópolis, Rosário Oeste, Santo Antônio do Leverger e Sorriso<sup>2</sup>.

Dentre as espécies de importância médica capturadas, *L. cruzi*, está incriminada na transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* em Mato Grosso do Sul<sup>4</sup> e *L. whitmani* que está associada à transmissão de *L. (V.) braziliensis*<sup>5</sup>.

A alta frequência de *L. cruzi* em municípios com alta incidência de casos humanos e taxa de infecção canina de 40%, no período de 1998 a 2005, em Jaciara/MT, sugere possível participação desta espécie na cadeia de transmissão da LV<sup>11</sup>.

A ocorrência de casos humanos e a presença do *L. cruzi*, tendo em vista que as fêmeas desta espécie alimentam-se mais facilmente e preferencialmente em humanos<sup>12</sup>, a ocorrência de cães positivos e a ausência de *L. longipalpis* no município, bem como a detecção de infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*, evidenciam a participação de *L. cruzi* na transmissão da LV em Jaciara/MT.