

DETECÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* sp. PELA REACÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) COLETADOS NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.

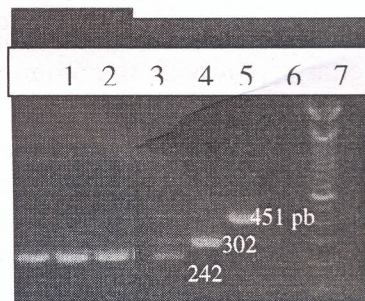
Edgar S. Pereira⁽¹⁾; Sérgio Luz⁽²⁾; Francimeire G. Pinheiro⁽³⁾; José F. Franco⁽³⁾ Rui A. de Freitas⁽³⁾ & Antonia Maria R. Franco⁽⁴⁾.

⁽¹⁾Bolsista CNPq/PIBIC. ⁽²⁾Co-orientador FIOCRUZ/CPQLMD. ⁽³⁾Colaboradores INPA/CPCS. ⁽⁴⁾Orientador INPA/CPCS.

A técnica de PCR e hibridização de DNA tem sido utilizada para o diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, devido a praticidade e aumento da sensibilidade na detecção da infecção por estes flagelados, amplificando a sequência alvo, que posteriormente poderá servir de substrato para reações de hibridização, dando suporte aos estudos epidemiológicos (Rodgers *et al.*, 1990). O índice de detecção da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* apresenta grande variabilidade e pode ser muitas das vezes devido a realização de capturas não direcionadas e na técnica de dissecação do aparelho digestivo do inseto para o exame e/ou isolamento do parasita, que geralmente é trabalhosa e demorada, nem sempre se consegue dissecar um elevado número de espécimens, assim como, muitas das vezes com o passar do tempo, dependendo da adequação do ambiente onde se encontram, estes vão morrendo, dificultando a dissecação. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* sp., em focos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) nos municípios de Manaus (Tarumã-Mirim e campus da Universidade Federal do Amazonas/UFAM) e Rio Preto da Eva (área de assentamento Iporá e Base de Instrução de Guerra na Selva-CIGS/BI-1) no Estado do Amazonas, utilizando-se a reação da polimerase em cadeia (PCR) pelo “nested-PCR”. Foram feitas capturas de flebotomos no ambiente silvestre, no período entre 7 às 10 horas da manhã, utilizando-se capturadores manuais para aspiração em bases de árvores. Os insetos foram mortos a -20°C e adicionados diretamente no conservante álcool etílico P.A absoluto, em seguida, as espécies dos flebotomos foram identificadas e as extrações de DNA foram realizadas de acordo com protocolo modificado do método de Coen *et al.* (1982). Após a extração do DNA individual de cada amostra, estes eram adicionados a reação da PCR, amplificando-se as regiões de mini-exon de flagelados do gênero *Leishmania*. A reação foi feita em duas etapas, com o objetivo de aumentar a sensibilidade, utilizando-se dois iniciadores em cada uma das reações [etapa 1: S1rev 5'-CAG AAA CTG ATA CTT ATA TAG-3' e SL2 5'-GTA TCA GTT TCT GTA CTT TAT TG-3'/ e etapa 2: SLM1 5'-GGT ATG CGA AAC TTC CGG-3' e SLM2 5'-CTG ATA CTT ATA TAG CGT TAG-3']. A

reação foi realizada em 35 ciclos de amplificação, sob as seguintes condições: desnaturação do DNA a 85° C por 4

min, 94° C por 7 min, 94° C por 20 seg., anelamento dos iniciadores a 50° C por 30 seg e extensão a 72° C por 20 seg. (com etapa final de 10 min.), terminando a 4° C. Os amplicóns obtidos após a amplificação referem-se aos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*, referente aos tamanho de: a) 451 pb para *L.infantum/ L. chagasi*, 302 pb para *L. amazonensis* (sub-gênero *Leishmania*) e 242 pb para *L. braziliensis* (sub-gênero *Viannia*). Ensaio utilizando-se a reação de “nested-PCR” foram realizados em amostras de DNA extraídos de: (i) flebotomíneos (*Lutzomyia. umbratilis*) machos e fêmeas coletados no campo e laboratório (negativos para infecção), (ii) fêmeas e machos de flebótomos acrescidos de flagelados (*Leishmania guyanensis*), (iii) fêmeas naturalmente infectadas com leishmânia, apresentando carga parasitária de + (01 à 05 parasitas por campo) a ++ (06 à 20 parasitas por campo) e (iv) flagelados das espécies: *L.chagasi*, *L. amazonensis*, *L.deanei*, *L. guyanensis*, *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* e *Endotrypanum schaudinni*. Os resultados obtidos foram de acordo com a presença de fragmentos amplificados de tamanhos que correspondem ao esperado nos géis de agarose, sendo também verificada positividade em flebótomos infectados com (+) e (++) com fragmentos de 242pb. Um total de 221 exemplares de 5 espécies [*L.umbratilis*, *L. anduzei*, *L.spathotrichia*, *L. flaviscutellata* e *Lutzomyia* sp. (Grupo *Shannoni*)] foram testados verificando-se a presença de fragmentos de 242pb referente ao sub-gênero *Viannia* em 02 das 43 (3,77%) fêmeas de *L. umbratilis* coletadas no campus da UFAM e 12 de 68 (17,39%) *L. umbratilis* do CIGS/BI-1. Este resultado preliminar demonstra a eficiência da técnica além de sua aplicação na identificação de áreas de focos endêmicos, tornando-se necessária a produção de sondas específicas a cada uma das espécies de leishmânias aprimorando o diagnóstico específico destes parasitas em material biológico.



Bibliografia:

Rodgers, M. R.; Popper, S. J.; Wirth, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol*, 71: 267-73, 1990.

Coen, E. S.; Thoday, J. M.; Dover, G. Rate of turnover of variants in the r DNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 295: 564-568, 1982.