

Vetores da doença de Chagas como potenciais transmissores de *Bartonella* spp..

Palavras-Chave: Bartonella, doença de Chagas, Barbeiro.

Autores/as:

Rafaela de Paula Silva (Faculdade de Enfermagem)

Luciene Silva Dos Santos (Faculdade de Ciências Médicas)

Marina Rovani Drummond (Faculdade de Ciências Médicas)

Allisson Daniel de Carvalho Gusmão (Faculdade de Ciências Médicas)

Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho (orientador) [Faculdade de Ciências Médicas]

INTRODUÇÃO:

As bartoneloses são doenças negligenciadas causadas por bactérias gram-negativas, fastidiosas e pertencentes ao gênero *Bartonella*. Estas bactérias têm uma ampla capacidade de infectar mamíferos e sua transmissão muitas vezes está relacionada a vetores. Atualmente este gênero apresenta 45 espécies e subespécies das quais 16 estão relacionadas a doenças em humanos. Vários artrópodes hematófagos como pulgas, piolhos, mosquitos e carrapatos já foram confirmados como vetores.

As bactérias do gênero *Bartonella* têm sido relacionadas a doenças descritas há centenas de anos (1). Apesar do esforço e dos avanços nas pesquisas nas últimas duas décadas, o conhecimento sobre a sua transmissão e patologia ainda é muito limitado (2). As bactérias também são conhecidas por infectarem eritrócitos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos,

geralmente causando bacteremia persistente em seus hospedeiros (3, 4).

A infecção pelas *Bartonellas* spp. têm uma ampla diversidade de manifestações clínicas que está relacionada a vários fatores, entre eles: a variedade de espécies e cepas, o que leva a diferenças na sua patogenicidade e ao desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves (5, 6); diferenças na resposta imune do hospedeiro e de outros fenômenos como coinfeção, imunossupressão, doenças não infecciosas concomitantes e desnutrição (7). A responsabilidade dos vetores na manifestação clínica das bartoneloses não é conhecida.

Estudo realizado com pacientes chagásicos demonstrou que a infecção por *Bartonella* spp. foi 40 vezes maior em pacientes com cardiomiopatia pela doença de Chagas quando comparado ao grupo controle (8).

A doença de Chagas é uma doença tropical infecciosa negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida pelas fezes dos vetores triatomíneos. Segundo a Organização

Mundial de Saúde, são responsáveis por mais de um bilhão de casos e causam mais de um milhão de mortes. A entrada do parasita no corpo do hospedeiro se dá pelo contato direto das fezes dos barbeiros com a lesão causada pela picada. A transmissão vetorial ocorre majoritariamente em áreas rurais, devido às condições ambientais que permitem uma maior concentração destes percevejos, além do convívio e a proximidade com os animais silvestres que são reservatórios da doença tais como o tatu, gambá, tamanduás entre outros. A doença de Chagas pode causar manifestações no coração, esôfago e intestino grosso não havendo justificativa para a predileção por uma ou outra forma da doença. A coinfeção com outros agentes poderia ser uma justificativa (9).

Tendo em vista que as bartonelas são transmitidas por vários vetores hematófagos, que o vetor da doença de Chagas é um hemíptero e que a prevalência da infecção por *Bartonella* sp. entre os pacientes com cardiomiopatia pela doença de Chagas foi maior que o grupo controle, sugere-se investigar se o triatomíneo também poderia agir como um vetor para a transmissão de *Bartonella* sp..

Este projeto de iniciação científica é parte de um maior e teve como objetivo a padronização e a realização de PCR de gene endógeno de barbeiro para o controle de qualidade do DNA extraído dos barbeiros envolvidos no projeto.

METODOLOGIA:

- **Preparação dos barbeiros para extração de DNA**

Barbeiros (*Rhodnius prolixus*)
provenientes de colônias de triatomíneos mantidas

no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências de Araraquara – Unesp de Araraquara utilizados nos experimentos foram preparados para a extração de DNA. Para isso, foram manipulados conforme fluxograma a seguir (Figura 1). Este procedimento foi realizado para minimizar a possibilidade de contaminação pelo ambiente externo e diminuir a quantidade de proteína na extração de DNA.



Figura 1- Fluxograma da lavagem dos barbeiros

- **Extração do DNA**

Foi realizado a extração de DNA dos barbeiros inteiros com o kit (Qiagen) conforme instrução do fabricante para a extração de tecidos.

- **PCR do gene endógeno**

Estas reações são utilizadas para verificar a presença de DNA e a ausência de inibidores de amplificação.

Foram padronizadas e realizadas as seguintes reações:

- 1- PCR que amplifica o fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou COX1) de vários filós de invertebrados (10).
- 2- PCR que amplifica um fragmento do gene 18S rRNA do DNA de qualquer eucarioto (11).
- 3- PCR que amplifica fragmento do gene 16S DNA ribossômico específica para Reduviidae (12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A reação foi padronizada com sucesso e está sendo realizada em todos os barbeiros extraídos no projeto.

- PCR que amplifica o fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou

COX1 de vários filós de invertebrados (10). A reação foi padronizada com a seguinte condição:

PCR – para Citocromo Oxidase I de vários filós de invertebrados		
Met F → GGTCACAAATCATAAAGATATTGG		
Met R → TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	6,75	GAPDH
Tampão 5x incolor	3	} 35 X 95° C – 2' 15'' 94° C – 15'' 54° C – 15'' 72° C – 15''
MgCl ₂ (25mM)	1,2	
dNTP (10µM)	0,3	
Primer TR1	0,3	
Primer TR2	0,3	
Tag (5u/µL)	0,15	72° C – 2'
Total Mix:	12	Tamanho esperado do fragmento: 710pb
DNA	3	

Figura 2 - Tabela de PCR – para Citocromo Oxidase I de vários filós de invertebrados

O tamanho esperado do amplificado é de 710 pb (Figura 3). Apesar de ter funcionado, não se mostrou tão sensível uma vez que não amplificou em todas as amostras.

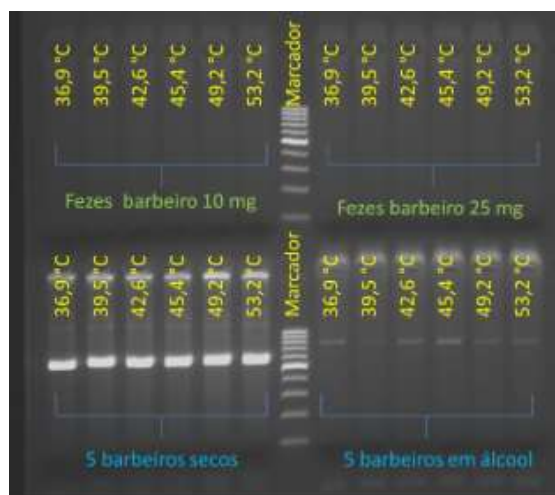


Figura 3 - Padronização PCR controle para invertebrados: gene mitocondrial Citocromo Oxidase I

- PCR que amplifica um fragmento do gene 18S rRNA do DNA de qualquer eucarioto (4). A reação foi padronizada com a seguinte condição:

PCR – para eucarioto		
18S EUC F → 5' – AGGATCCATTGGAGGGCAAGT		
18S EUC R → 5' – TCCACTACGAGCTTTTAACTGCA		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	12,875	
Tampão 5x incolor	5	95° C – 5'
MgCl ₂ (25mM)	2	94° C – 30'
dNTP (10µM)	0,5	64° C – 30'
EucF (10µM)	1	72° C – 20''
EucR (10µM)	1	72° C – 5'
Taq (5u/µL)	0,125	4° C – ∞
Total Mix:	22,5	Tamanho esperado do fragmento: 99pb
DNA	2,5	

Figura 4 - Tabela de PCR – para eucarioto

Nesta reação espera-se que o fragmento amplificado seja de 99pb (Figura 5).

Utilizamos esta reação para qualquer amostra de eucarioto, mas principalmente para as amostras provenientes de animal não-mamífero, como no caso de patos utilizados como fonte alimentar dos barbeiros no insetário. Apesar de ter sido padronizada, como há formação de uma segunda banda logo abaixo da primeira por causa do anelamento do *primer* nele mesmo, além da grande possibilidade de contaminação ambiente, esta reação só será utilizada se não houver outra disponível para o agente em questão.

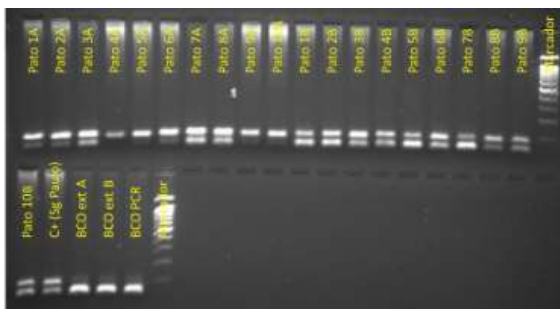


Figura 5 - Padronização da PCR controle para eucariotos: gene 18S rRNA do DNA

- PCR que amplifica fragmento do gene 16S DNA ribossômico específica para Reduviidae

(12). A reação foi padronizada com a seguinte condição:

PCR – para reduviidae		
Red F → CGCCTGTTTATCAAAAACAT		
Red R → CTCCTGGTTTGAAGCTCAGATCA		
Primeira Reação – BH1		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	12,875	BH nested PCR1
Tampão 5x incolor	5	94° C – 2'
MgCl ₂ (25mM)	2	94° C – 30''
dNTP (10µM)	0,5	X° C – 30''
BHF(10µM)	1	72° C – 4,5''
BHR (10µM)	1	72° C – 7'
Taq (5u/µL)	0,125	Tº 52,1
Total Mix:	22,5	Tamanho esperado do fragmento: 400pb
DNA:	2,5	

Figura 6 - Tabela de PCR – para reduviidae

O tamanho esperado do fragmento é de aproximadamente 400pb (Figura 7)

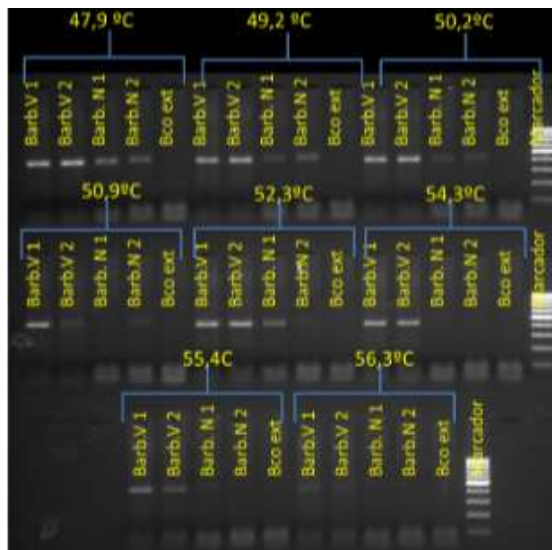


Figura 7 - Padronização PCR controle para a família Reduviidae

CONCLUSÕES:

As reações foram padronizadas e estão sendo utilizadas na rotina do projeto em todas as amostras seja de barbeiros ou de fontes alimentares como os patos.

Graças a estas padronizações, o DNA de *Bartonella henselae* pode ser detectado em barbeiros por meio de reações espécie-específica.

BIBLIOGRAFIA

1. Schultz MG. A history of bartonellosis (Carrion's disease). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1968;17(4):503-15.
2. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2011;301(1):7-15.
3. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS microbiology reviews*. 2012.
4. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and veterinary entomology*. 2008;22(1):1-15.
5. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Jr., Giordano A, Cassone M. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(1):3-8.
6. Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology*. 2007;153(Pt 7):2045-51.
7. Breitschwerdt EB. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet Dermatol*. 2017;28(1):96-e21.
8. Corrêa FG, Pontes CL, Verzola RM, Mateos JC, Velho PE, Schijman AG, et al. Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(7):644-51.
9. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277-82.
10. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3(5):294-9.
11. Kim MJ, Yoo I, Yang SM, Suh SM, Kim HY. Development and validation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of chicken, turkey and duck in processed meat products. *International Journal of Food Science & Technology*. 2018;53:2673-9.
12. Weirauch C, Munro JB. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;53(1):287-99.