

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

Autores/as:

Rafaela de Paula Silva – Faculdade de Enfermagem

Marina Rovani Drummond – Faculdade de Ciências Médicas

Luciene Silva Dos Santos – Faculdade de Ciências Médicas

Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho – 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. Um estudo mostrou que pacientes com cardiopatias chagásicas têm 40 vezes mais chances de estarem infectados com *Bartonella sp.* em relação ao grupo controle saudável. Diante destes dados, sugere-se que os percevejos hematófagos da família dos triatomíneos e vetores da doença de Chagas (*Rhodnius neglectus*), possam ser potenciais vetores de *Bartonella spp.*. O resultado deste projeto pode sugerir que os pacientes chagásicos sejam testados para este outro patógeno que também pode causar cardiomiopatias. Este projeto de iniciação científica desenvolveu parte de um projeto maior, financiado pela Fapesp, e teve como objetivo de avaliar a prevalência da infecção natural por *Bartonella sp.* em triatomíneos coletados em campo, utilizando ferramentas de detecção molecular como PCR convencional, PCR de dupla amplificação e PCR em tempo real.

METODOLOGIA:

Preparação dos barbeiros para a extração

Barbeiros (*Rhodnius prolixus*) provenientes do município de Seabra-BA, coletados em peridomicílio 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 lavagem de barbeiros para extração de DNA

Extração do DNA

A extração de DNA dos barbeiros foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante para a extração de tecidos.

Quantificação do DNA

O DNA extraído foi analisado em NanoDrop para a verificação da quantidade e da qualidade do DNA.

Amplificação do DNA

- PCR Convencional

Para verificação da integridade e da presença de DNA extraído, foi realizada PCR convencional em que foram utilizados *primers* para a região 16S rDNA específicos para a família *Reduviidae* descritos por Weirauch *et al.* (1). Esta PCR é utilizada como controle de qualidade e espera-se que haja amplificação em todas as amostras, o que indica presença de DNA íntegro e ausência de inibidores de PCR.

Também foram realizadas outras reações específicas para a detecção de DNA de *Bartonella sp.* em todas as amostras:

- PCR de dupla amplificação para *B. henselae*

PCR de dupla amplificação (*nested*) espécie-específica para a região alvo *ftsZ* da *Bartonella henselae* (3).

Os produtos das reações da PCR convencional e *nested* foram analisados em gel de agarose corado com GelRed (Biotium).

- PCR em tempo real para *B. henselae*

PCR qualitativa em tempo real utilizando sonda de hidrólise com a enzima *Master Mix for Probe-Based Real-Time qPCR* (Promega) (4) para a região alvo *gltA*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- Extração do DNA e quantificação:

Foram extraídos o DNA de 100 barbeiros e realizada a quantificação em Nanodrop. A quantidade de DNA extraído é expressa pelo equipamento em nanogramas por microlitro. Sendo assim, quanto maior este número, maior é a quantidade de DNA na amostra analisada. Os valores da concentração ficaram entre 2,1 e 380,3ng/μL. O resultado da razão entre absorbâncias medidas a 260nm e 280nm expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos. A pureza 260/280 é dada de forma que, quanto mais próxima de 1,8, maior é a pureza do ácido nucleico. A razão 260/230, pode indicar contaminação com diversos compostos como carboidratos e proteínas. Os valores ideais estão geralmente entre 1,8 e 2,2, um pouco acima de seus respectivos valores 260/280. As relações 260/280 e 260/230 se mostraram abaixo do esperado. Isso pode ser atribuído à grande quantidade de proteína que as amostras apresentaram, porém, tal fato não influenciou nas amplificações do gene endógeno.

- PCR Convencional – *Reduviidae*

PCR convencional em que foram utilizados os primers para a região 16S rDNA específicos para a família *Reduviidae*, as amostras apresentaram amplificação e as extrações foram validadas conforme imagens a seguir:



Figura 2 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado do gene endógeno de *Reduviidae* – 1 ao 47

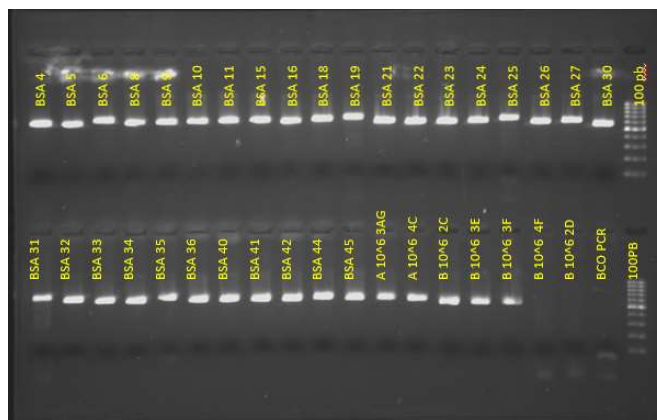


Figura 3 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado do gene endógeno de *Reduviidae* – Repetição dos não-amplificados da Figura. 2

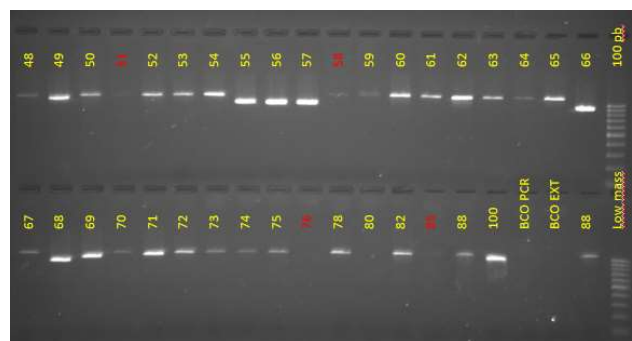
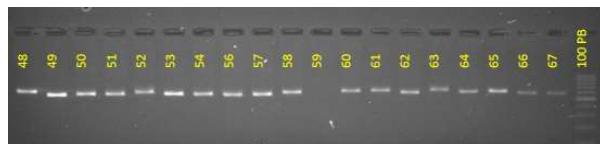


Figura 4A e B - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado do gene endógeno de Reduviidae – 48 ao 100

- PCR de dupla amplificação (*nested*) para *B. henselae*

Todas as amostras foram submetidas a PCR de dupla amplificação espécie-específica para a região alvo *ftsZ* da *B. henselae* e dentre elas 15 amostras amplificaram o DNA da *B. henselae*. O tamanho esperado do amplificado é de 218pb.

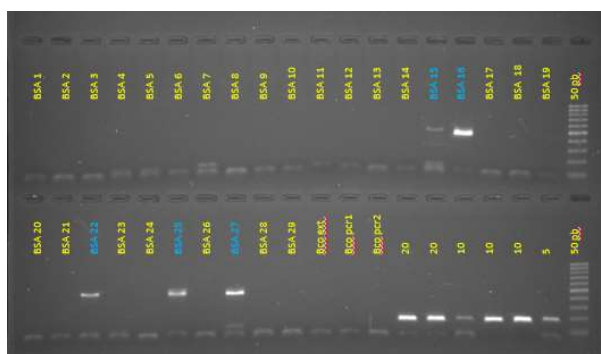


Figura 6 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado da PCR *nested* espécie-específica para *B. henselae* (tamanho esperado do amplificado: 218pb)

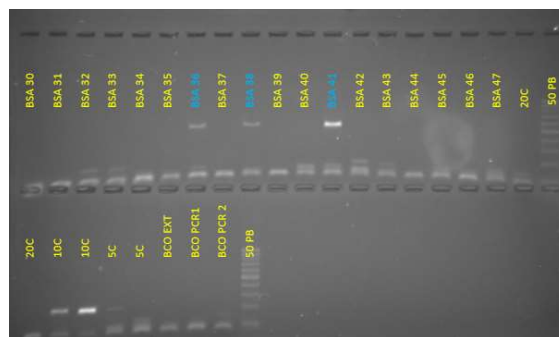


Figura 7 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado da PCR *nested* espécie-específica para *B. henselae* (tamanho esperado do amplificado: 218pb)

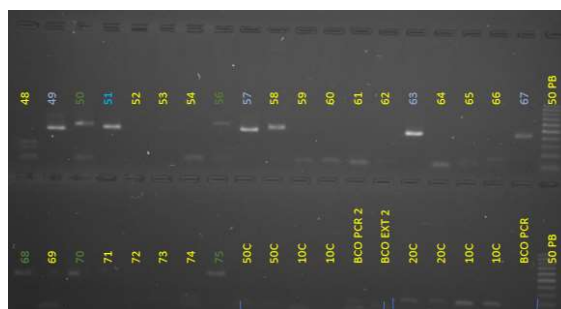


Figura 8 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado da PCR nested espécie-específica para *B. henselae* (tamanho esperado do amplificado: 218pb)

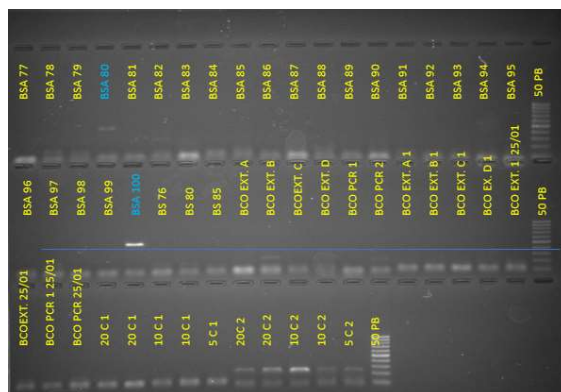


Figura 9 - Gel de agarose 2% corado com GelRed para a visualização do amplificado da PCR nested espécie-específica para *B. henselae* (tamanho esperado do amplificado: 218pb)

- PCR em tempo real qualitativa para *B. henselae*

Na PCR qualitativa em tempo real realizada, 52 amostras amplificaram o DNA de *B. henselae*.

CONCLUSÕES:

Diante dos resultados, fica evidente que barbeiros (*Rhodnius prolixus*), provenientes de coletas em peridomicílio no município de Seabra-BA, estão contaminados com *B. henselae*.

Estes percevejos podem estar associados à transmissão desta bactéria, o que reforça a necessidade de investigação de *B. henselae* para pacientes chagásicos com cardiomiopatias.

BIBLIOGRAFIA

1. Weirauch C, Munro JB. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2009 Oct;53(1):287-99.
2. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res.* 2007 2007 Sep-Oct;38(5):697-710.
3. awasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, Yamamoto L, Del Negro GM, Okay TS. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013 2013 Jan-Feb;55(1):1-6.
4. Staggemeier R, Pilger DA, Spilki FR, Cantarelli VV. MULTIPLEX SYBR® GREEN-REAL TIME PCR (qPCR) ASSAY FOR THE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF *Bartonella henselae* AND *Bartonella clarridgeiae* IN CATS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014 2014 Mar-Apr;56(2):93-5.