

1º SEMINÁRIO REGIONAL — SOBRE — LEISHMANIOSE VISCERAL

Florianópolis - SC



Laboratório de
PROTOZOOLOGIA
UFSC

Programa de Pós-Graduação em
BIOTECNOLOGIA & BIOCIÊNCIAS
mestrado & doutorado

Pesquisas Acadêmicas sobre Leishmanioses em Santa Catarina

Prof. Mário Steindel

mario.steindel@ufsc.br

www.proto.ufsc.br

Setembro de 2015

Leishmanioses em Santa Catarina

Histórico

- 1989-1990: Primeiro relato de casos autóctones de LTA na Região Oeste – *São Thiago P.T. & Guida U. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 23: 201-203, 1990.*
- 1994-1997: Relato de 26 casos de LTA importados e autóctones – *Steindel M. & Lima Filho J.H. Arq Cat Med. 27: 25-31, 1988.*
- 2000: Identificação de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* – *Grisard et al. Acta Trop. 74: 89-93, 2000.*
- 2005- 2008: Identificação de potenciais vetores *Nyssomia neivai*, *Lu. fischeri*, e *Lu. ayrozai* e infecção natural em *Ny. neivai* em Bal. Piçarras – *Marcondes et al. Trans R Soc Trop Med Hyg. 103: 1093-1097, 2009.*

Leishmanioses em Santa Catarina

Histórico

- 2005-2006: Surto de LTA no Vale do Itajaí
- 2007: primeiro caso autóctone de LTA na Ilha de Santa Catarina.
- 2010-2011: Surto de LVC na Lagoa da Conceição, Florianópolis. *Figueiredo et al. Acta Scientiae Veterinariae, 40: 1026, 2012*; *Steindel et al. Pesq. Vet. Bras. 33:490-496, 2013.*
- 2004 -2013: Confirmados seis casos de LVH importada em Santa Catarina.
- Atualmente: LTA presente em mais de 20 municípios do Estado e LVC na Ilha de Santa Catarina.



Estudo de Epidemiologia Molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Santa Catarina

**Marcel Asbury Marlow – PPG Biotecnologia e Biociências
2010-2013.**

Questões epidemiológicas abordadas com ferramentas moleculares para diferenciação das espécies e cepas de *Leishmania*

Tipagem da espécie

- ✓ Identificação e diferenciação de espécies autóctones e importadas
- ✓ Identificação das espécies associadas com a falha ao tratamento/forma clínica

Tipagem da cepa

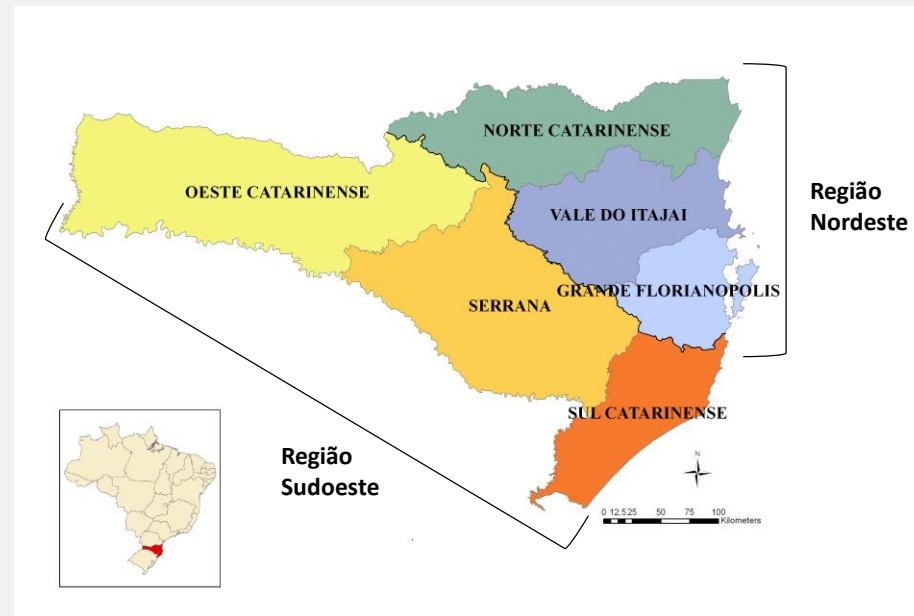
- ✓ Identificação da origem de novos genótipos
- ✓ Busca de genótipos relacionados com a resistência à droga/forma clínica
- ✓ Detecção de genótipos particulares responsáveis por epidemias
- ✓ Estudo da estrutura populacional em espécies de *Leishmania*
- ✓ Estudo de fluxo gênico entre as populações

Comparação de ferramentas moleculares utilizadas no estudo de epidemiologia da Leishmaniose

Alvo	Isoenzimas	Impressão digital	kDNA	hsp70 cpB/gp63	ITS1	Genes constitutivos	Micro-satélites
Método	MLEE	DNA-FP RAPD	PCR-RFLP	PCR-RFLP	Sequenciamento	MLST Sequenciamento	MLMT fragment analysis
Resolução							
Espécie	X	X	X	X	X	X	-
Clado	X	X	-	X	X	X	X
Cepa	-	(X)	-	(X)	(X)	-	X
Tipo de amostra	Cultura	Cultura	Amostra clínica	Amostra clínica	Amostra clínica	[Cultura]	[Cultura]
Reprodutibilidade	Boa	Inferior	Inferior	Boa	Boa	Boa	Boa
Comparação interlaboratorial	Possível se mesma metodologia	Difícil	Difícil	X	X	X	X
Co-dominância	X	-	-	-	-	X	X
Neutralidade	X/-	X	Não determinado	-	Não determinado	X/-	X
Simplicidade	-	X	X	X			
Alto rendimento	-	-	-	-	X	X	X

Área de estudo e coleta de dados

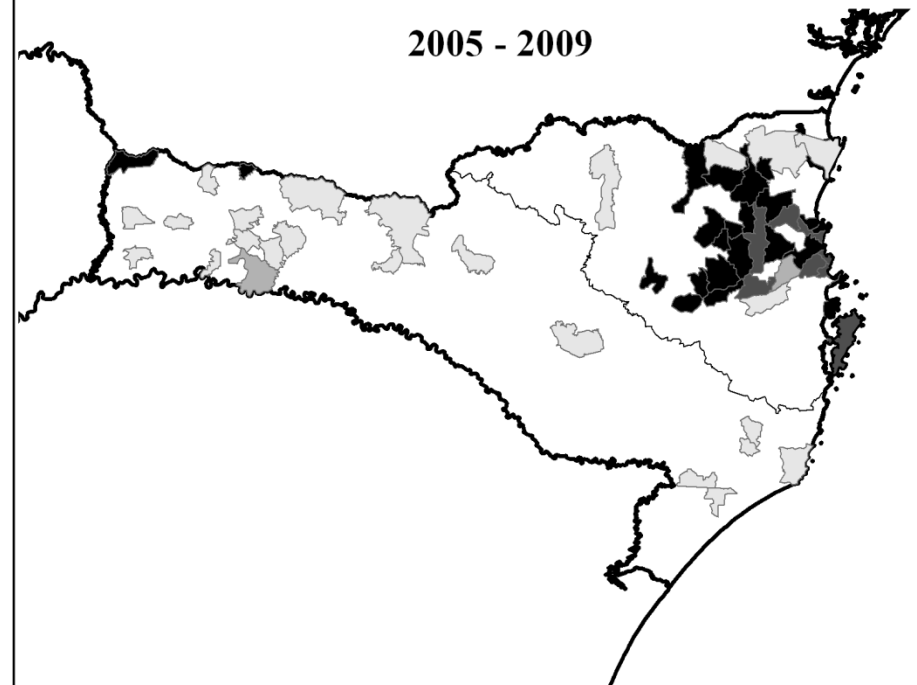
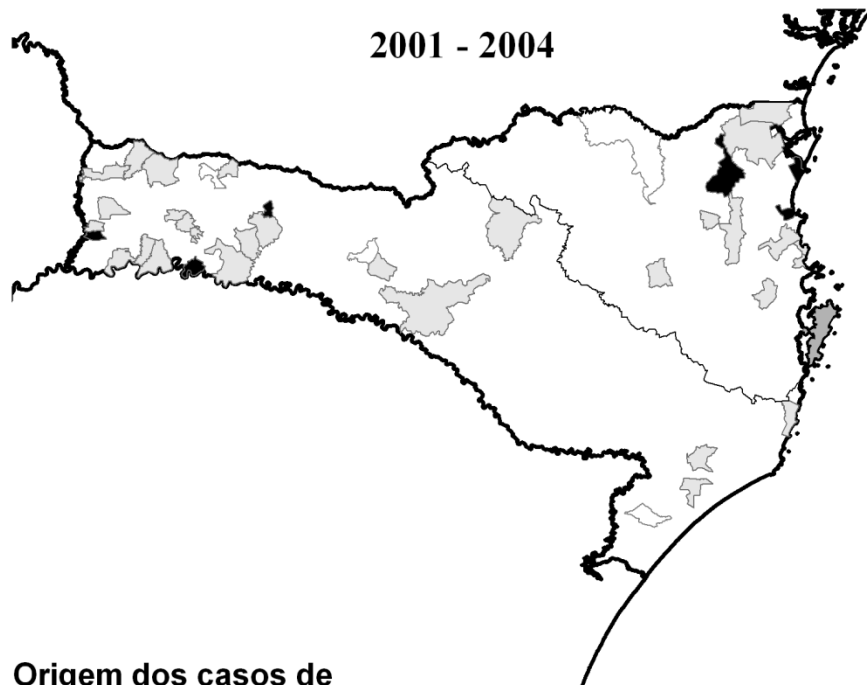
- Casos *confirmados* de LTA notificados no Estado de Santa Catarina
- Período de Estudo: 2001-2009
 - Laboratório de Proto (UFSC) era o Laboratório de Referência Estadual para o diagnóstico de Leishmanioses até 2009
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)
- Estudo aprovado no CEPESH da UFSC (003/07/CEPSH) março de 2007



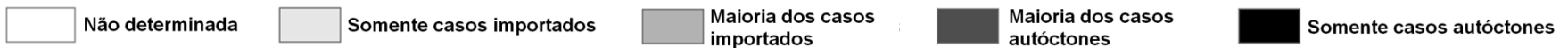
Análise

- Estatística
 - SAS 9.1.3
 - Teste de qui-quadrado/Teste exato de Fisher
 - Regressão logística multivariada
 - Com base na análise bivariada
 - Teste de Hosmer and Lemeshow goodness of fit
- Espacial
 - Geocoder
 - ArcGIS 10

A Leishmaniose Tegumentar Americana é emergente em Santa Catarina, com áreas endêmicas recentes na Região Nordeste.



Origem dos casos de leishmaniose tegumentar americana



**Há diferenças entre os perfís de LTA no
Estado por Região?**

Perfil de casos de LTA diferem entre as regiões nordeste e sudoeste do Estado por características clínicas e demográficas.

Característica		Região Nordeste no. (%)	Região Sudoeste no. (%)	Valor de p	Total no. (%)
Faixa etária	0-10	33 (7,04)	1 (1,37)	0,0208	34 (6,27)
	11-20	69 (14,71)	8 (10,96)		77 (14,21)
	21-30	75 (15,99)	14 (19,18)		89 (16,42)
	31-40	94 (20,04)	13 (17,81)		107 (19,74)
	41-50	77 (16,42)	11 (15,07)		88 (16,24)
	50-65	96 (20,47)	14 (19,18)		110 (20,30)
	>65	24 (5,12)	11 (15,07)		35 (6,46)
	ND	1 (0,21)	1 (1,37)		2 (0,37)
Gênero	Mulher	170 (36,25)	7 (9,59)	<0,0001	177 (32,66)
	Homem	299 (63,75)	66 (90,41)		365 (67,34)
Raça ou etnia	Indígena	0 (0,00)	0 (0,00)	0,2653	0 (0,00)
	Branca	426(90,83)	67 (91,78)		493 (90,96)
	Negra	10 (2,13)	3 (4,11)		13 (2,40)
	Amarela	1 (0,21)	0 (0,00)		1 (0,18)
	Parda	21 (4,48)	0 (0,00)		21 (3,87)
	ND	11 (2,35)	3 (4,11)		14 (2,58)
Total		469 (86,53)	73 (13,47)		542 (100,00)

Perfil de casos de LTA diferem entre as regiões nordeste e sudoeste do Estado por características clínicas e demográficas

Característica		Região Nordeste no. (%)	Região Sudoeste no. (%)	Valor de p	Total no. (%)
Zona de residência	Urbana	372 (79,32)	50 (68,49)	0,0003	422 (77,86)
	Rural	53 (11,30)	21 (28,77)		74 (13,65)
	Periurbana	31 (6,61)	1 (1,37)		32 (5,90)
	ND	13 (2,77)	1 (1,37)		14 (2,58)
Origem do caso	Autóctone	395 (84,22)	6 (8,22)	<0,0001	401 (73,99)
	Importado	47 (10,02)	55 (75,34)		102 (18,82)
	ND	27 (5,76)	12 (16,44)		39 (7,20)
Forma clínica	Cutânea	455 (97,01)	61 (83,56)	<0,0001	516 (95,20)
	Mucocutânea	14 (2,99)	12 (16,44)		26 (4,80)
Evolução do caso	Curado	446 (95,10)	64 (87,67)	0,0294	510 (94,10)
	Recidiva	18 (3,84)	7 (9,59)		25 (4,61)
	ND	5 (1,07)	2 (2,74)		7 (1,29)

Quais são os Fatores de Risco para um Caso de LTA ser Recidiva em Santa Catarina?

A regressão logística multivariada prevê se um caso de LTA tem maior probabilidade de ser recidiva

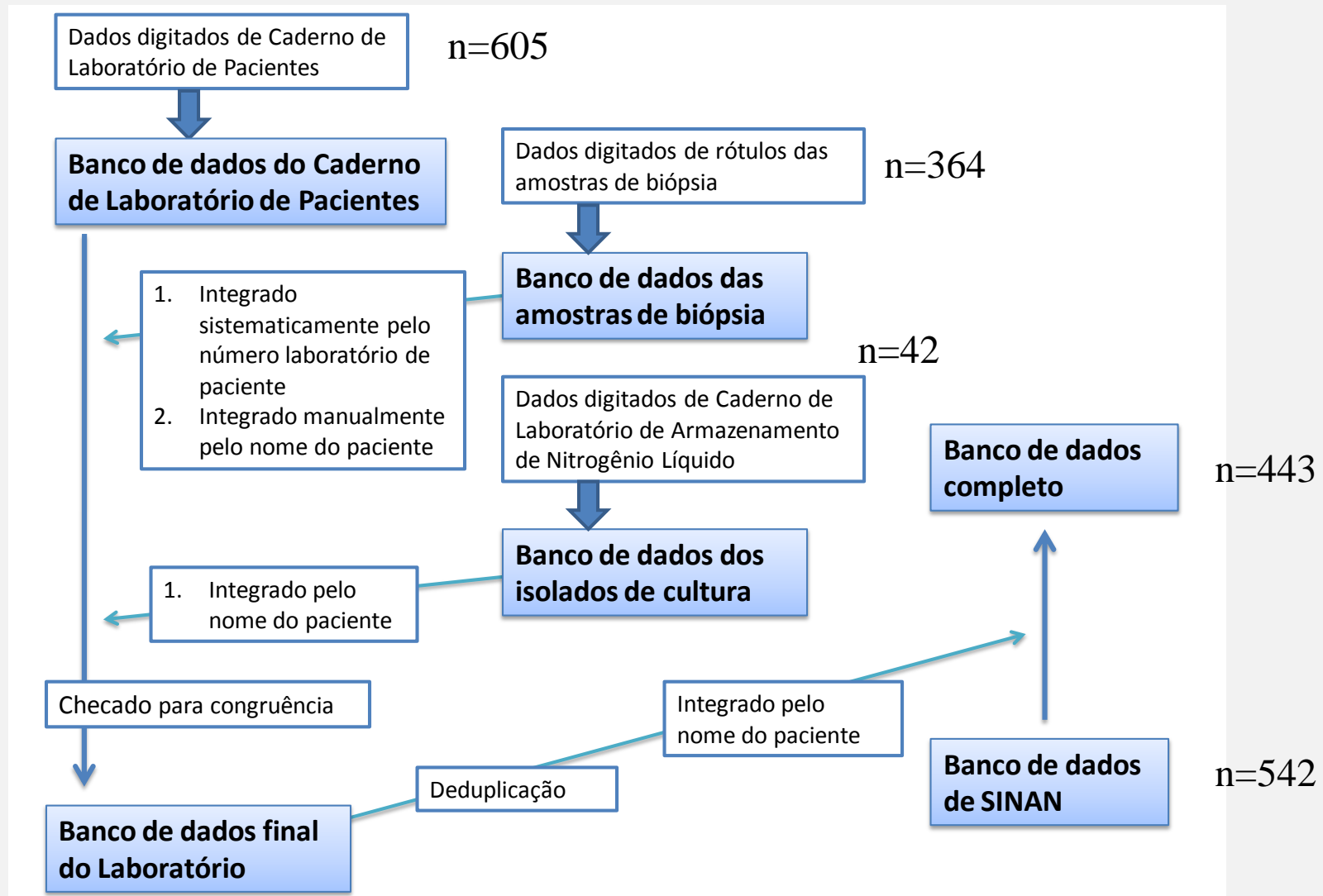
Fator de risco potencial	Odds ratio não ajustado	IC 95%	Odds ratio ajustado	IC 95%
Homem	1.95	0.72 – 5.28	-	-
Viver numa zona rural	1.16	0.39 – 3.48	-	-
50 anos de idade ou mais velhos	2.44*	1.09 – 5.49	1.52	0.55 - 4.19
Mucocutânea	10.05*	3.75 – 26.94	1.82	0.43 - 7.78
Importados de estados brasileiros	8.96*	3.27 – 24.51	7.35†	2.56 - 21.09

A chance de recidiva em casos importados foi sete vezes maior que em casos autóctones

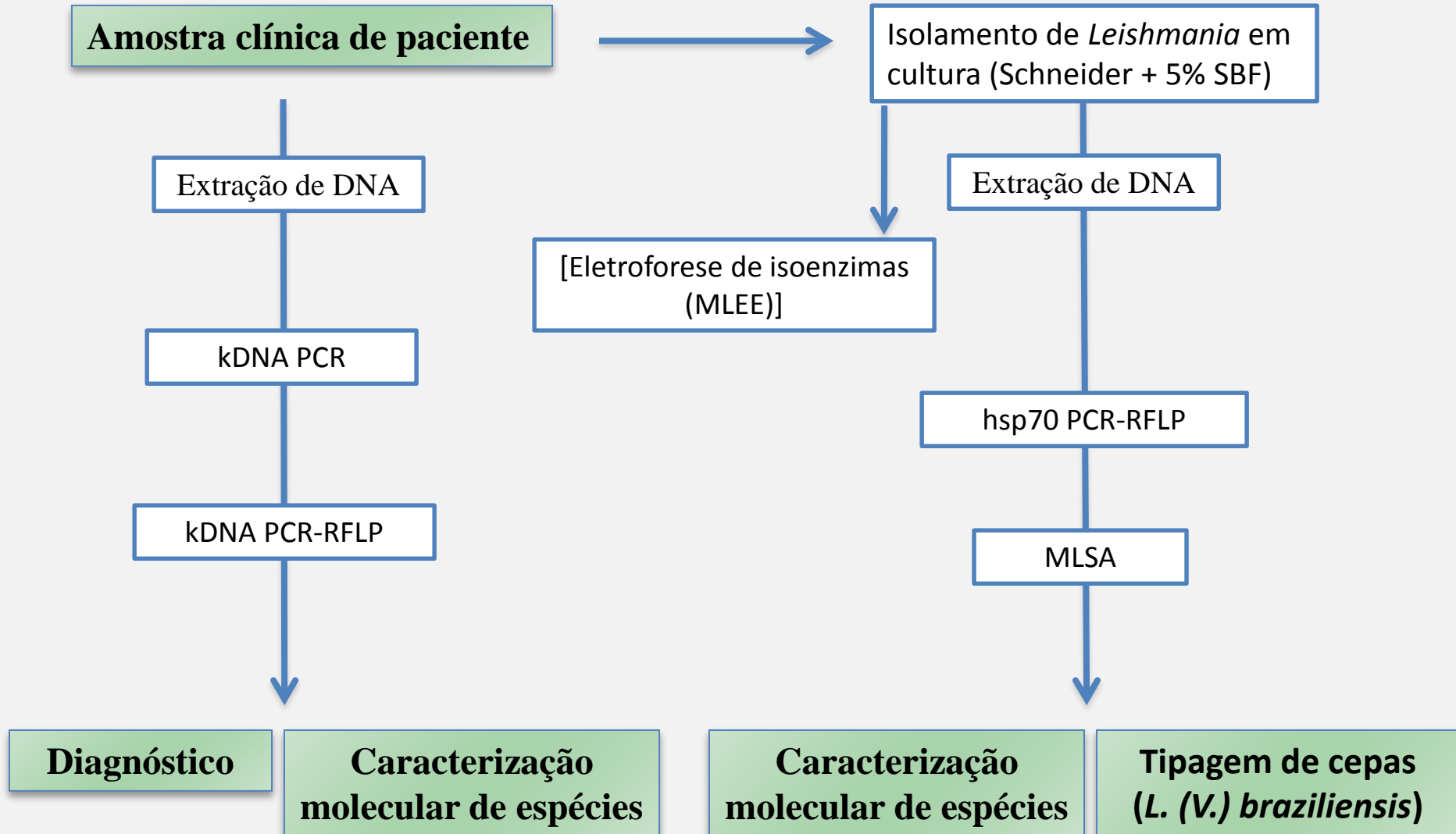
* $p < 0,05$, † $p < 0,001$

- ✓ Identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* presentes no Estado de Santa Catarina
- ✓ Analisar a relação entre as variáveis epidemiológicas e espécies de *Leishmania*

Coleta de dados laboratoriais e “merge” com dados do SINAN

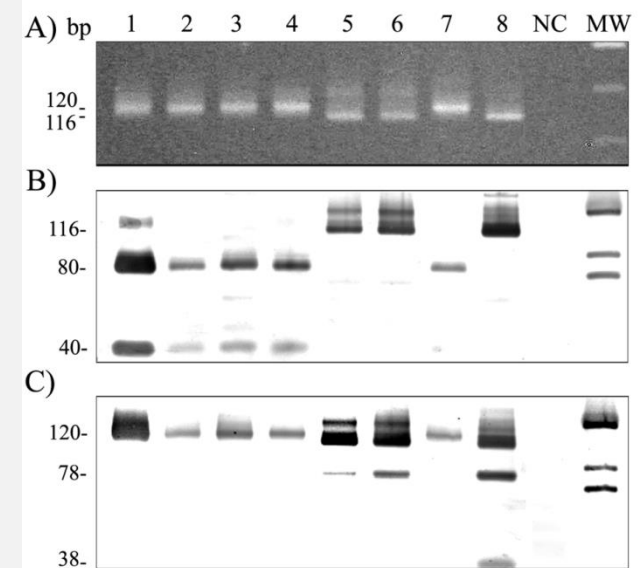


Caracterização das Amostras

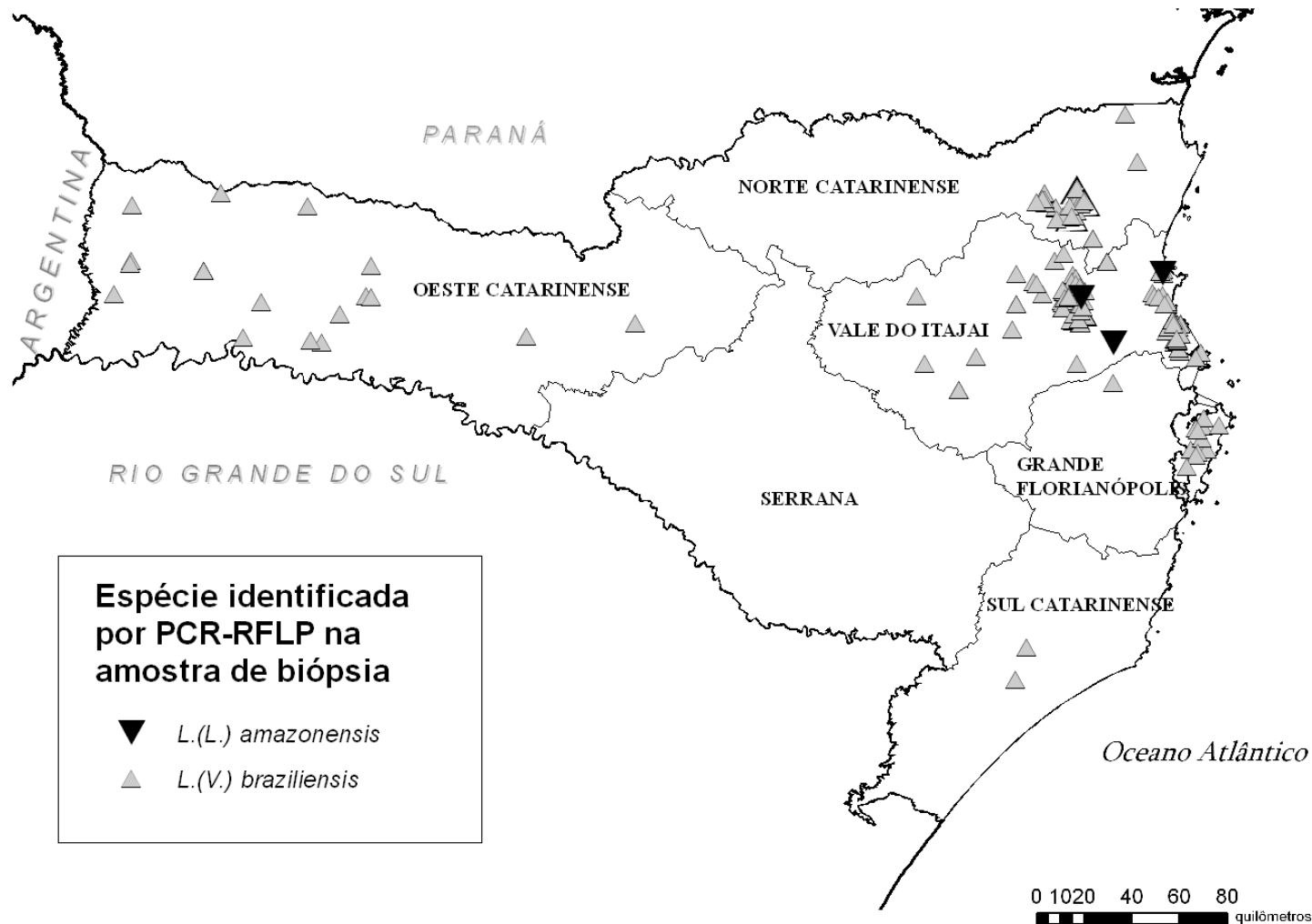


L. (V.) braziliensis é a espécie predominante no Estado de Santa Catarina.

- 251 (46,31%) disponíveis para análise de PCR-RFLP de kDNA
- 248 (98,80%) *L. (V.) braziliensis*
- Três casos de *L. (L.) amazonensis*
 - Importado em 2001 do Estado de Mato Grosso
 - Dois autóctones dos anos de 2002 e 2005
- Confirmada em 38 amostras por PCR-RFLP hsp70 e MLEE



Todos os casos positivos na RFLP para *L. (L.) amazonensis* estavam localizados na região NE.



Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier

Maríel Asbury Marlow¹, Marise da Silva Mattos², Maria Ernestina Makowiecky³, Iriane Eger⁴, Andre Luiz Rossetto⁴, Edmundo Carlos Grisard¹, Mário Steindel^{1*}

1 Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, **2** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Department of Zoonoses, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, **4** Center for Health Sciences, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Brazil

- ✓ Estudar a variabilidade genética e os possíveis conglomerados genéticos de *L. (V.) braziliensis* em Santa Catarina
- ✓ Avaliar a capacidade dos seis loci gênicos de análise de sequências multilocus (MLSA) para distinguir características epidemiológicas entre as populações de *L. (V.) braziliensis*

Análise de sequências multilocus (MLSA)

Locus	Tamanho de amplicon (~pb)	Tamanho de sequência analisada (pb)	Sequências do iniciador (5'-3')
6PGD	836	666	CTCAAGGAACATGAGCACGA TTGTCCTTGACTTGCTCACG
MPI	681	569	GGCAAGATGTATGCGGAGTT CTCCCCAGGAACCATCTGTA
ICD	1022	755	GAATCGGGAAGGAGATCACA CATCATAGCCCCAGAGAGGA
hsp70	1350	896	GGACGAGATCGAGCGCATGGT TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG
MDHmt	821	666	TGCCGACCTCTTCCATATTC GAGTGAGGTGCGTCTTCACA
MDHnc	1010	803	TCACAACCGCAACTACGA CTACTCACGATAACGGCAGA

Análise de sequências multilocus (MLSA)

Com base numa população que tem:

- Grande amostragem
- Recombinação
- Amostras muito semelhantes

eBURST v3 -> Complexos clonais

- Quais são os grupos exatos de tipos das sequências?

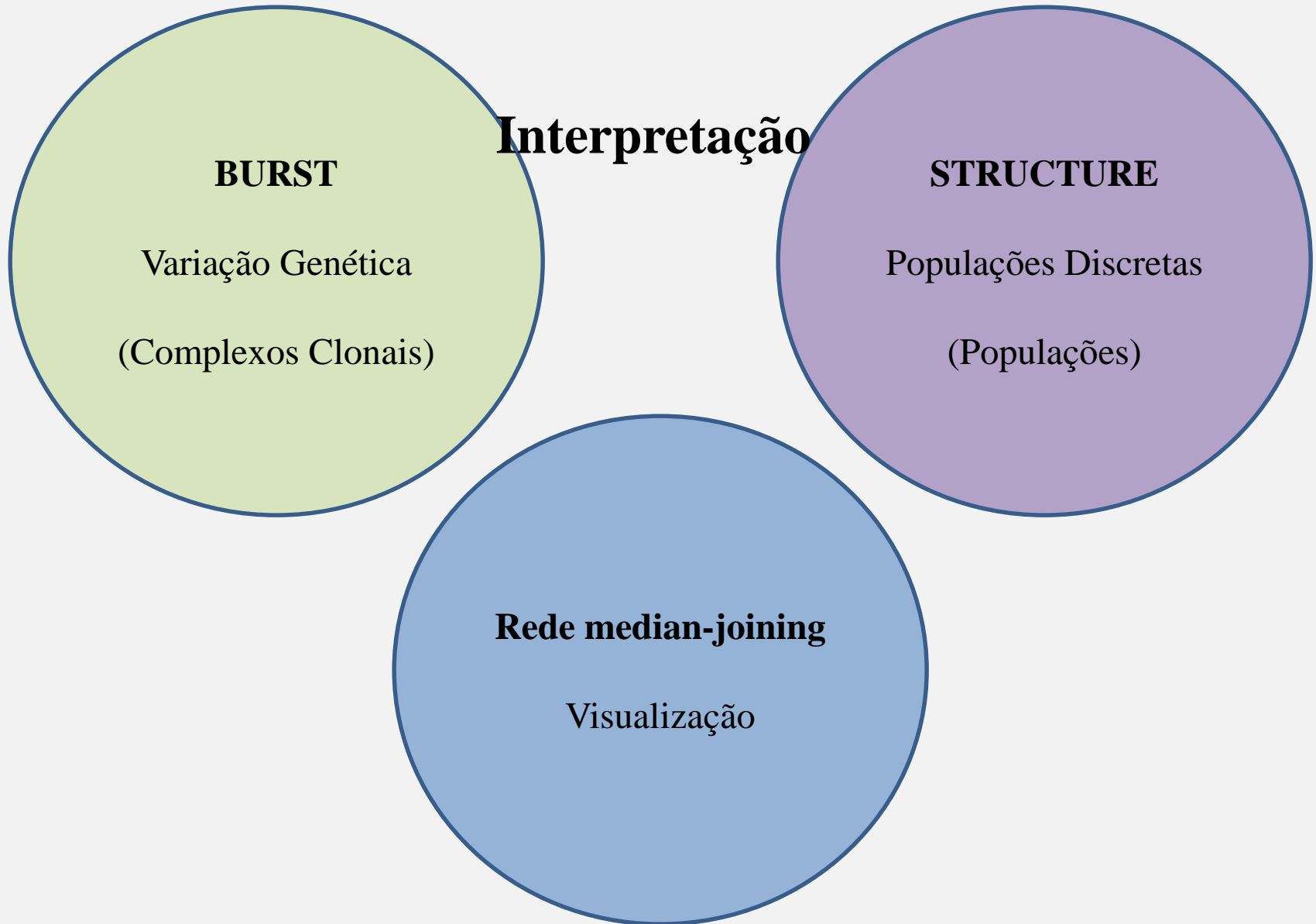
STRUCTURE 2.3.4 -> Estrutura populacional

- Se tomarmos todas as combinações possíveis, e em seguida, tomar uma amostra aleatória, como as populações parecem?

SplitsTree4 -> Redes

- Qual é a rede construída a partir das divisões (locais ambíguos)

Análises da MLSA



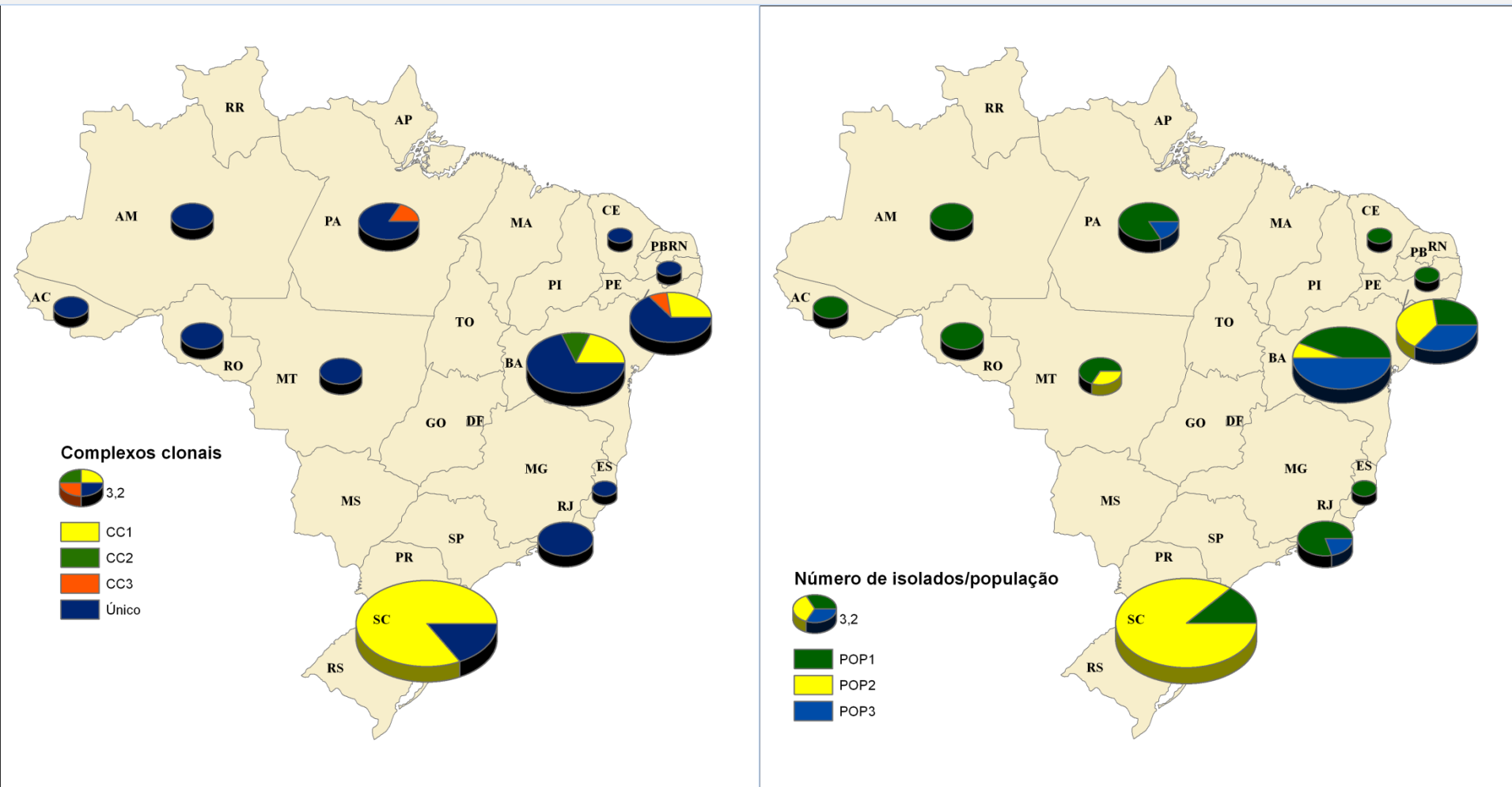
As cepas de *L. (V.) braziliensis* de Santa Catarina estão geneticamente relacionadas com as cepas de outros Estados?

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* de Santa Catarina são geneticamente homogêneos em comparação com cepas de outros estados brasileiros.

Complexo clonal					
Estado	CC1	CC2	CC3	Único	Total
AC	0	0	0	2	2
AM	0	0	0	3	3
BA	3	2	0	11	16
CE	0	0	0	1	1
ES	0	0	0	1	1
MT	0	0	0	3	3
PA	0	0	1	5	6
PB	0	0	0	1	1
PE	3	0	1	7	11
RJ	0	0	0	5	5
RO	0	0	0	3	3
SC	28	0	0	5	33
Total	34	2	2	47	85

População				
Estado	1	2	3	Total
AC	2	0	0	2
AM	3	0	0	3
BA	7	1	8	16
CE	1	0	0	1
ES	1	0	0	1
MT	2	1	0	3
PA	5	0	1	6
PB	1	0	0	1
PE	3	4	4	11
RJ	4	0	1	5
RO	3	0	0	3
SC	4	29	0	33
Total	36	35	14	85

Distribuição geográfica dos complexos clonais e subpopulações de *L. (V.) braziliensis*



$F_{ST} : POP2/POP1 = 0,15$ e $POP2/POP3 = 0,20$
(Diferenciação genética alta, Wright, 1978)

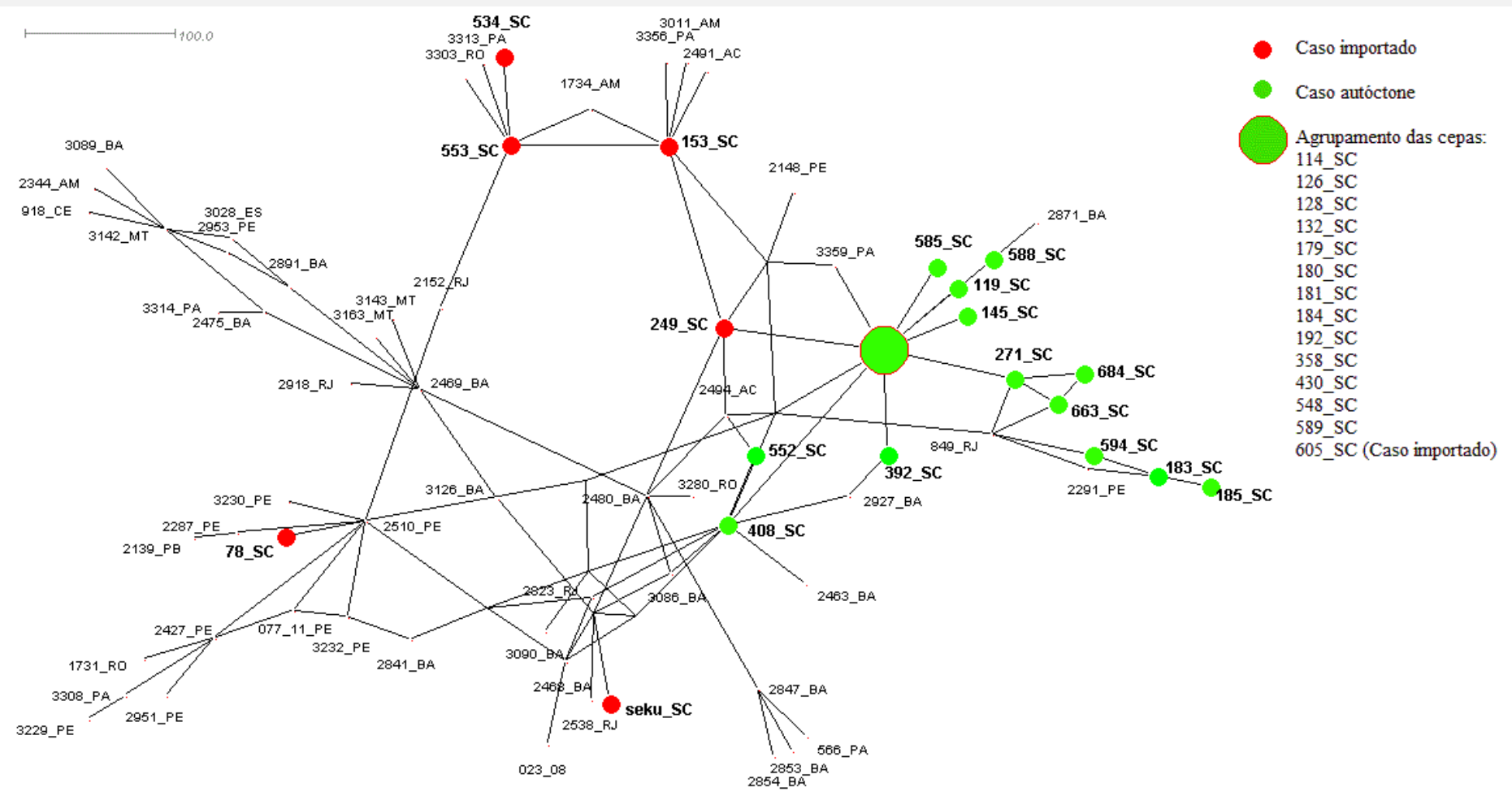
Os seis loci gênicos propostos para MLSA podem ser usados como Ferramenta Epidemiológica para *L. (V.) braziliensis*?

Características epidemiológicas dos pacientes puderam ser correlacionadas com as características genéticas dos isolados

- As 5 amostras de SC que não-CC1 foram importados
- As 4 amostras de SC que não-POP2 foram importados
- Forma clínica mostrou associação significativa com população ($p= 0.0296$)

Forma Clinica	População			Total
	1	2	3	
Cutânea	29	32	10	71
Disseminada	2	0	0	2
Mucocutânea	1	2	4	7
Total	32	34	14	80

Rede median-joining de 86 haplótipos de *L. (V.) braziliensis*, com origem do caso designado para as cepas de Santa Catarina



Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation

Maríel A. Marlow¹, Mariana C. Boité², Gabriel Eduardo M. Ferreira², Mario Steindel¹, Elisa Cupolillo^{2*}

1 Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil,

2 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Conclusões

- ✓ A LTA é uma doença endêmica recente no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil
- ✓ Ciclo de transmissão estabelecido
- ✓ Sudoeste e Nordeste do Estado diferem significativamente em seus perfis de casos
- ✓ A alta taxa de casos urbanos de LTA
- ✓ A existência de um ciclo de transmissão doméstico ou peri-doméstico
- ✓ A alta taxa de recidiva em casos importados

Conclusões

- ✓ *L. (V.) braziliensis* foi a espécie predominante
- ✓ A elevada homogeneidade genética sugere que o aparecimento da LTA no estado de Santa Catarina em casos humanos é um evento recente
- ✓ *L. (L.) amazonensis* foi identificada em casos autóctones
- ✓ Não existe nenhum registro de suas espécies vetoras conhecidas
- ✓ MLSA revelou padrões epidemiológicos intra-espécie
- ✓ A adição dos marcadores MDHnc e MDHmt ao painel aumentou o poder discriminatório

Conclusões do Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania sp.* em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC realizado pela FIOCRUZ (26 de set a 01 de out 2010).

- 1) Neste momento, embora um dos roedores tenha sido encontrado infectado, não parece haver um ciclo de transmissão de *Leishmania sp.* bem estabelecido entre os pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos da localidade de Cantos dos Araçás, Florianópolis/SC;
- 2) O único animal encontrado infectado apresentava baixa carga parasitária e certamente não pode ser responsável pela manutenção do parasito na área, ou seja, não é um reservatório. A origem desta infecção não parece ser o ambiente silvestre;
- 3) Os achados anteriores de cães infectados, com altas cargas parasitárias e potencial de infectividade ao vetor apontam para a importância destes como os reservatórios do parasito na área.

Fonte: Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses/IOC-Fiocruz, 2011, 28 pp.



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil



Nelí Maziero^a, Vanete Thomaz-Soccol^{a,*}, Mário Steindel^b, Juliana Seger Link^c,
Diego Rossini^d, Silvana M. Alban^a, Aguinaldo J. Nascimento^e

Municípios de São Miguel do Oeste e Descanso

252 cães - 16,7% soropositivos

Novo foco?????

Desafios e Perspectivas

- Colaboração continuada com o CCZ e SES
- Investigação da viabilidade destes seis marcadores para *L. infantum*
- Estudo caso-controle com controles populacionais
- Estudos epidemiológicos bem desenhados com coleta prospectiva
- Determinação de vetores e reservatórios (ciclo de transmissão completa) de LTA e especialmente de *L. infantum*

Agradecimentos

Colaboradores

Dra Mariel Marlow - CDC

Dr. Álvaro Menin - UFSC

Dra. Marise Mattos – UFRJ/SES

Dra Elisa Cupolilo – FIOCRUZ

Dr. Edmundo C. Grisard – UFSC

Dr. André Báfica – UFSC

Dra. Patricia H. Stoco – UFSC

Dra. Iriane Eger - UEPG

Dr. André Pitaluga - FIOCRUZ

Greicy Malaquias – doutoranda

Fabio Inda – mestrando

