

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA MARA RODRIGUES DA SILVA LIEBEL

INFECÇÃO NATURAL DE *Leishmania* sp. EM *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*  
(LUTZ & NEIVA, 1912), NO MUNICÍPIO DE ADRIANÓPOLIS, PARANÁ:  
PADRONIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE.

Curitiba

2012

SANDRA MARA RODRIGUES DA SILVA LIEBEL

INFECÇÃO NATURAL DE *Leishmania* sp. EM *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*  
(LUTZ & NEIVA, 1912), NO MUNICÍPIO DE ADRIANÓPOLIS, PARANÁ:  
PADRONIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - área de Concentração de Parasitologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Magda Costa Ribeiro

Curitiba

2012

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro pela oportunidade, confiança e por possibilitar o meu ingresso na vida científica.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Magda Costa Ribeiro, por toda ajuda nas técnicas moleculares, pela dedicação, amizade e pelo auxílio em todos os momentos que precisei.

À minha querida e amada mãe Zélia que me ensinou afrentar os obstáculos da vida e pelas suas constantes orações.

Ao meu amado marido Samuel que sempre esteve ao meu lado durante as horas difíceis do mestrado, pelos seus conselhos de incentivo e coragem.

Aos meus sogros Dona Fátima e seu Sérgio por todo o apoio nas horas que precisei.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Débora do Rocio Klisiowicz, pela atenção e por ter contribuído para esse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giseli Klassen pela sua ajuda e apoio, se mostrando sempre prestativa nos momentos que a procurei.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Shimada pelas sugestões para melhoria da minha dissertação.

Ao doutorando André Luiz Gonçalves, pela ajuda nas coletas e na identificação dos flebotomíneos.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, Ricardo, André Mello, Déberli, Cláudia, Luciane e Jaqueline, pelos momentos de conversas descontração e risadas.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos queridos moradores de Adrianópolis que sempre nos receberam em suas propriedades para coletas dos flebotomíneos, uma experiência incrível conhecê-los.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose de grande importância na saúde pública. No Paraná, a LTA é endêmica nas regiões norte, nordeste, centro-sul e Vale do rio Ribeira, sendo esta última a região escolhida para realização deste estudo. Assim, foram realizadas coletas de flebotomíneos, no município de Adrianópolis, no período de julho de 2010 a junho de 2011, nos ambientes domicílio, peridomicílio e mata. O objetivo deste trabalho foi investigar a infecção natural por *Leishmania* sp. em fêmeas de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912) pela técnica de reação em cadeia pela polimerase e padronizar a técnica de sensibilidade para *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. Para a captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas CDC, instaladas no domicílio, peridomicílio e mata, durante o período das 18 às 6 horas. Após a coleta, os insetos foram identificados e separados em tubos contendo álcool 80%. Noventa e nove por cento dos flebotomíneos coletados pertenciam à espécie *Lu. (N.) intermedia* s.l. Para análise da sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de *L. (V.) braziliensis*, foram utilizadas 10, 50 e 100 promastigotas em grupos de 1,3,6 e 10 flebotomíneos machos e comparados para três métodos de extração de DNA: Chelex 100 (BioRad), fenol/clorofórmio e o kit comercial Charge Switch®. Para análise de infecção natural de *Lu. (N.) intermedia* s.l. por *Leishmania* sp., 1014 fêmeas foram divididas em 133 *pools* de 1 a 10 flebotomíneos. A sensibilidade da PCR foi detectada para todos os grupos de flebotomíneos e diluições de promastigotas realizadas. O método de extração mais eficiente, prático e de baixo custo foi o Chelex. Foram encontrados 2 *pools* positivos para *Leishmania* sp., cada um com 10 flebotomíneos, sendo provenientes das coletas realizadas na mata no mês de julho de 2010. Dos flebotomíneos analisados foi encontrada a taxa mínima de infecção de 0,2%. Em Adrianópolis, a espécie *Lu. (N.) intermedia* s.l. é considerada o principal vetor de *Leishmania* sp., dada sua abundância, prevalência nos ecótopos e por estar naturalmente infectada por este parasito. Este é o primeiro trabalho que relata infecção natural de *Lu. (N.) intermedia* por *Leishmania* sp. na região do Vale do rio Ribeira no estado do Paraná. Os resultados obtidos nesse estudo revestem-se de grande importância na epidemiologia da leishmaniose na região do Vale da Ribeira porque elucida o papel de *Lu. (N.) intermedia* na transmissão de *Leishmania* sp.

Palavras-chave: infecção natural, leishmaniose tegumentar americana, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*, *Leishmania* sp., PCR.

## ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a zoonosis of great importance in public health. In Paraná, the ACL is endemic in the north, northeast, central-south and Ribeira River Valley, the latter being the region chosen for this study. Thus, we collected sand flies in the city of Adrianópolis, from July 2010 to June 2011, inside of houses, peridomiliary areas, and forest. The objective of this study was to investigate natural infection by *Leishmania* sp. in females of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912) by the technique of polymerase chain reaction and standardize sensitivity for *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. For the capture of sandflies were used CDC light traps installed inside of houses, peridomiliary areas, and forest during the period from 18 to 6 hours. After collection, insects were identified and separated into tubes containing 80% alcohol. Ninety-nine percent of sand flies collected belonged to the species *Lu. (N.) intermedia* s.l. To analyze the sensitivity of the technique of polymerase chain reaction (PCR) of *L. (V.) braziliensis* were used 10, 50 and 100 promastigotes in groups of 1,3,6 and 10 males sandflies and compared for three methods of DNA extraction: Chelex 100 (BioRad), phenol / chloroform and the commercial kit Charge Switch®. For the analysis of natural infection of *Lu. (N.) intermedia* s.l. by *Leishmania* sp., 1014 females were divided into 133 pools 1-10 sandflies. The sensitivity of PCR were detected for all groups of sandflies promastigotes and dilutions made. The extraction method more efficient, convenient and low cost is the Chelex. Two pools were found positive for *Leishmania* sp., with 10 sandflies, and from the surveys carried out in the To analyze the sensitivity of the technique of polymerase chain reaction (PCR) of *L. (V.) braziliensis* were used 10, 50 and 100 promastigotes in groups of 1,3,6 and 10 males sandflies and compared for three methods of DNA extraction: Chelex 100 (BioRad), phenol/ chloroform and the commercial kit Charge Switch®. For the analysis of natural infection of *Lu. (N.) intermedia* s.l. by *Leishmania* sp., 1014 females were divided into 133 pools 1-10 sandflies. The sensitivity of PCR were detected for all groups of sandflies promastigotes and dilutions made. The extraction method more efficient, convenient and low cost is the Chelex. Two pools were found positive for *Leishmania* sp., each with 10 sand flies, and from the surveys carried out in the woods in July 2010. Of the analyzed sandflies found the minimum infection rate of 0.2%. In Adrianópolis, the species *Lu. (N.) intermedia* s.l. is considered the main vector of *Leishmania* sp., their abundance, and prevalence in ecotopes to be naturally infected by this parasite. This is the first study reporting natural infection of *Lu. (N.) intermedia* by *Leishmania* sp. in the Vale do Ribeira in the State of Paraná. The results of this study are of great importance in the epidemiology of leishmaniasis in the Ribeira Valley region because it clarifies the role of *Lu. (N.) intermedia* in the transmission of *Leishmania* sp. in July 2010. Of the analyzed sandflies found the minimum infection rate of 0.2%. In Adrianópolis, the species *Lu. (N.) intermedia* s.l. is considered the main vector of *Leishmania* sp., their abundance, and prevalence in ecotopes to be naturally infected by this parasite. This is the first study reporting natural infection of *Lu. (N.) intermedia* by *Leishmania* sp. in the Vale do Ribeira in the State of Paraná. The results of this study are of great importance in the

epidemiology of leishmaniasis in the Ribeira Valley region because it clarifies the role of *Lu. (N.) intermedia* in the transmission of *Leishmania* sp.

Keywords: natural infection, leishmaniasis, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Leishmania* sp., PCR.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Leishmaniose .....	14
2.2 Ciclo de Vida da <i>Leishmania</i> sp.....	15
2.3 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	16
2.4 Vetor .....	18
2.5 Infecção Natural dos Flebotomíneos por <i>Leishmania</i> .....	20
2.5.1 Métodos de Extração de DNA.....	23
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Descrição da Área de Coleta dos Flebotomíneos .....	25
4.2 Coleta dos Flebotomíneos .....	26
4.3 Identificação dos Flebotomíneos .....	27
4.4 Procedimentos para Análise da Sensibilidade da PCR na Detecção de <i>L.(V.) braziliensis</i> em <i>Lu. (N.) intermedia</i> .....	28
4.4.1 Obtenção das Formas Promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> .....	28
4.4.2 Formação de grupos de Flebotomíneos Machos e Formas Promastigotas para Avaliar a Sensibilidade da PCR .....	29
4.4.3 Extração de DNA.....	30
4.4.3.1 Extração de DNA Realizada com Fenol-Clorofórmio .....	30
4.4.3.2 Extração de DNA Realizada com Kit Comercial Charge Switch.....	31
4.4.3.3 Extração de DNA Realizada com Chelex .....	32
4.4.4 Amplificação do DNA de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	33
4.4.5 Eletroforese. ....	33
4.5 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> sp em <i>Lu.(N.) intermedia s.l.</i> naturalmente infectada	34
4.5.1 Cálculo da Taxa Mínima de Infecção.....	34
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 Flebotomíneos Coletados .....	35
5.2 Avaliação dos Métodos de Extração de DNA e sensibilidade da PCR para Detecção de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	36
5.2.1 Grupo A .....	36
5.2.2 Grupo B .....	37
5.2.3 Grupo C .....	38
5.2.4 Grupo D .....	39
5.3 Detecção do DNA de <i>Leishmania</i> sp em <i>Lutzomyia (N.) intermedia</i> utilizando a Técnica de PCR .....	40

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>47</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>58</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (MS, 2010).

A prevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem aumentado na América Latina nos últimos 20 anos, especialmente no Brasil. Ocorre em todos os Estados, acometendo pessoas de todas as faixas etárias e de ambos os sexos. No período de 1990 a 2009 foram registrados 550.250 casos no Brasil, desses 11.959 casos foram registrados no estado do Paraná o que corresponde a 95,0% dos casos na Região Sul (Tabela 1).

A LTA é endêmica nas regiões nordeste, centro-sul, norte e Vale do rio Ribeira no Estado do Paraná (Figura 1). A área de estudo escolhida para o presente trabalho foi o município de Adrianópolis na Região do Vale do rio Ribeira. Segundo DUNAISKI (2006) e dados da Secretaria do Estado do Paraná (Tabela 2), no período de janeiro de 2001 a setembro de 2011 foram assinalados 133 casos de LTA em humanos nesta região. Neste período, o maior índice registrado foi em 2008 com 31 casos. A maioria da população (68,2%) no Vale do Ribeira vive na zona rural, sendo Adrianópolis uma das áreas mais pobres do estado do Paraná. A principal ocupação é a agricultura de subsistência o qual produzem banana, feijão e cana de açúcar. Segundo CASTRO *et al.* (2005), no mês de março (outono) ocorreu maior número de pacientes com lesões de leishmaniose, embora picos também foram observados em junho e outubro. Parece que as atividades antrópicas associadas às condições climáticas favorecem a ocorrência de casos de LTA nesta região.

GRIMALDI *et al.*, desde 1989, já afirmavam que a frequência da LTA em várias regiões do Brasil tem mudado dramaticamente, devido à devastação das florestas que vem dando lugar as atividades agro-pastoris. O envolvimento do homem pode ser de caráter esporádico e/ou oportunista, em contato com ambiente florestal ou em área urbana quando este viabiliza condições propícias ao estabelecimento dos flebotomíneos e este se adapta ao convívio alimentando-se de sangue dos animais domésticos (TEODORO & KUHL, 1997). Segundo FORATTINI *et al.* (1976) e FERREIRA *et al.* (2001), a transmissão está relacionada com as condições climáticas: altitudes de 800 m acima do nível do mar, temperatura ao redor de 20°C e umidade acima de 90% ótimas para a atividade dos flebotomíneos. Segundo VOLF & MYSKOVA (2007), mudanças do clima, a expansão dos assentamentos humanos e movimentos acelerados de humanos e animais ao redor do mundo, levam a um aumento do risco de propagação de doenças transmitidas por vetores incluindo as leishmanioses.

Por serem as leishmanioses doenças de importância para a saúde pública, várias pesquisas vêm buscando informações sobre agentes, reservatórios e vetores da *Leishmania* sp., para entender melhor a epidemiologia da doença e propor medidas de prevenção e controle.

**TABELA 1 - CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL, DE ACORDO COM AS REGIÕES E UNIDADES FEDERADAS DE 1990 A 2009.**

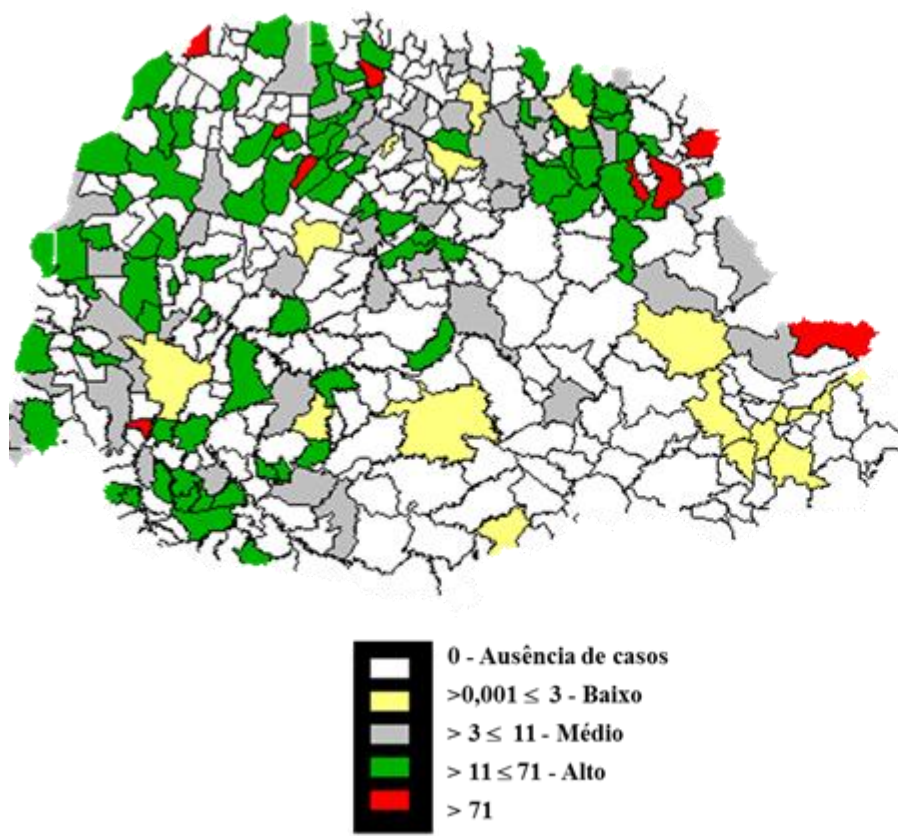
Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>Região Norte</b>	<b>7.318</b>	<b>9.359</b>	<b>9.720</b>	<b>9.739</b>	<b>11.306</b>	<b>13.117</b>	<b>9.987</b>	<b>11.058</b>	<b>6.078</b>	<b>9.129</b>	<b>11.140</b>	<b>8.107</b>	<b>10.207</b>	<b>13.508</b>	<b>13.125</b>	<b>10.679</b>	<b>8.833</b>	<b>9.890</b>	<b>8.680</b>	<b>8.272</b>
Rorondônia	1346	2118	2220	2822	2249	2499	1738	1.465	1.317	1.737	1.421	1.563	1.812	1.980	2.181	1.668	1.204	971	941	1.035
Acre	59	252	403	563	372	365	490	413	280	490	903	717	1.076	1.385	1.532	1.356	1.124	913	972	906
Amazonas	1733	2590	3424	1982	741	1557	988	2.290	715		1.744	2.153	2.130	3.816	2.212	1.957	1.554	2.219	1.778	1.439
Roraima	170	507	492	605	470	251	303	308	244	146	352	454	451	303	160	280	285	340	350	441
Pará	3269	3196	2236	2543	5748	7054	5042	5.038	2.177	5.051	5.565	2.521	3.741	4.862	5.324	4.345	3.554	4.305	3.623	3.347
Amapá	185	394	475	643	895	645	563	902	892	884	592	52	377	555	1162	580	595	667	629	513
Tocantins	556	302	470	581	831	736	863	642	453	821	563	647	620	607	554	493	517	475	387	591
<b>Região Nordeste</b>	<b>12.428</b>	<b>12.020</b>	<b>7.140</b>	<b>8.218</b>	<b>14.426</b>	<b>13.887</b>	<b>11.303</b>	<b>11.868</b>	<b>8.455</b>	<b>9.112</b>	<b>13.078</b>	<b>11.149</b>	<b>9.373</b>	<b>7.985</b>	<b>7.863</b>	<b>8.112</b>	<b>6.169</b>	<b>5.925</b>	<b>6.003</b>	<b>6.910</b>
Maranhão	3109	3926	2027	2868	6262	4725	3794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.658	4.364	3.777	3.072	3.395	2.174	2.335	1.661	1.624
Piauí	249	324	161	72	56	40	96	102	96	106	95	164	151	126	117	257	152	108	73	104
Ceará	3848	2862	1358	1463	1928	4262	2793	2787	1490	1372	3043	2543	2123	1329	2054	1977	1006	935	700	993
Rio Grande do Norte	20	6	...	13	4	15	42	49	26	13	11	8	5	8	13	10	7	6	6	56
Paraíba	85	165	342	273	264	196	173	233	113	128	177	50	68	56	74	68	46	60	53	109
Pernambuco	680	474	378	436	806	891	714	667	643	979	1.149	518	556	558	719	337	413	446	388	501
Alagoas	28	54	53	71	224	114	81	144	72	156	258	88	80	97	65	57	33	111	89	77
Sergipe	54	50	24	46	46	52	19	47	34	30	58	93	61	16	7	11	6	4	10	11
Bahia	4355	4159	2797	2976	4836	3592	3591	3.205	3.626	3.323	3.799	2.027	1.965	2.018	1.732	2.000	2.332	1.920	3.023	3.435
<b>Região Sudeste</b>	<b>2.347</b>	<b>3.386</b>	<b>3.854</b>	<b>4.771</b>	<b>3.763</b>	<b>2.605</b>	<b>2.369</b>	<b>2.294</b>	<b>2.945</b>	<b>3.963</b>	<b>2.938</b>	<b>2.112</b>	<b>2.894</b>	<b>3.252</b>	<b>2.540</b>	<b>2.809</b>	<b>2.868</b>	<b>1.898</b>	<b>1.592</b>	<b>1.605</b>
Minas Gerais	1338	2134	2504	2547	2040	1574	1504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.116	1.610	1.767	1.507	1.802	1.855	1.322	1.123	1.021
Espírito Santo	670	728	722	893	490	307	244	404	646	884	548	351	209	234	146	193	241	109	76	100
Rio de Janeiro	227	319	269	496	396	241	282	302	186	269	250	169	289	226	209	317	283	119	55	92
São Paulo	112	205	359	835	837	483	339	143	140	129	266	476	786	1.025	678	497	489	348	338	392
<b>Região Sul</b>	<b>192</b>	<b>139</b>	<b>690</b>	<b>819</b>	<b>1.361</b>	<b>796</b>	<b>617</b>	<b>430</b>	<b>455</b>	<b>460</b>	<b>853</b>	<b>568</b>	<b>943</b>	<b>932</b>	<b>607</b>	<b>541</b>	<b>573</b>	<b>514</b>	<b>630</b>	<b>464</b>
Paraná	192	139	690	819	1361	794	616	428	453	457	850	553	909	886	579	444	409	438	533	409
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	10	14	28	17	84	158	67	87	45
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	5	20	18	11	13	6	9	10	10
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>2.468</b>	<b>3.546</b>	<b>3.264</b>	<b>3.907</b>	<b>4.247</b>	<b>5.343</b>	<b>4.721</b>	<b>4.640</b>	<b>2.981</b>	<b>6.384</b>	<b>4.605</b>	<b>4.629</b>	<b>4.839</b>	<b>4.980</b>	<b>4.460</b>	<b>4.388</b>	<b>3.852</b>	<b>3.095</b>	<b>3.005</b>	<b>4.492</b>
Mato Grosso do Sul	221	165	304	215	243	568	178	433	256	338	158	372	301	235	192	139	116	99	118	105
Mato Grosso	2021	3200	2682	3346	3734	4492	4195	3.779	2.283	5.504	3.921	3.816	4.067	4.189	3.752	3.639	3.181	2.715	2.521	3.900
Goiás	226	181	277	345	270	281	348	414	440	532	525	411	441	500	458	578	505	246	351	460
Distrito Federal	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	30	30	56	58	32	50	35	15	27
UF Ignorada	---	---	---	---	---	---	1.033	1.013	887	1.299	1.106	71	105	157	142	156	102	85	82	81
<b>Brasil</b>	<b>24.753</b>	<b>28.450</b>	<b>24.668</b>	<b>27.454</b>	<b>35.103</b>	<b>35.748</b>	<b>30.030</b>	<b>31.303</b>	<b>21.801</b>	<b>30.367</b>	<b>33.720</b>	<b>26.636</b>	<b>28.361</b>	<b>30.814</b>	<b>28.737</b>	<b>26.685</b>	<b>22.397</b>	<b>21.407</b>	<b>19.992</b>	<b>21.824</b>

FONTE: SINAN/SVS/MS (2010)

**TABELA 2 – CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO PARANÁ, RESIDENTES NA 2ª REGIONAL DE SAÚDE DE 2007 A 2011.**

<b>Município</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>Total</b>
Adrianópolis	23	31	14	4	5	77
Agudos do Sul	0	0	0	0	0	0
Almirante Tamandaré	2	2	0	2	0	6
Araucária	0	1	2	1	0	4
Balsa Nova	0	0	0	0	0	0
Bocaiúva do Sul	0	0	0	0	0	0
Campina Grande do Sul	0	0	0	0	0	0
Campo do Tenente	0	0	0	0	0	0
Campo Largo	3	0	0	0	0	3
Campo Magro	0	0	0	0	0	0
Cerro Azul	20	38	19	10	2	89
Colombo	0	3	2	0	0	5
Contenda	0	0	0	0	0	0
Curitiba	5	6	10	13	3	37
Doutor Ulysses	3	2	4	2	0	11
Fazenda Rio Grande	0	0	0	0	1	1
Itaperuçu	4	0	2	0	0	6
Lapa	0	0	0	0	0	0
Mandirituba	0	0	0	0	0	0
Pien	0	0	0	0	0	0
Pinhais	1	1	0	0	0	2
Piraquara	0	0	1	0	0	1
Quatro Barras	0	0	0	0	0	0
Quitandinha	0	0	0	0	0	0
Rio Branco do Sul	1	0	1	1	0	3
Rio Negro	0	0	0	0	0	0
São José dos Pinhais	0	0	0	0	0	0
Tijucas do Sul	0	0	0	0	0	0
Tunas do Paraná	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>84</b>	<b>55</b>	<b>33</b>	<b>11</b>	<b>245</b>

FONTE: SESA/SVS/DEVE/DVIEP/SINANNET



**Figura 1.** Coeficiente de detecção de LTA por 100.000 habitantes – Paraná.

FONTE: CR's/FUNASA/CENEPI/COVEPI/GTDTVA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. De acordo com LEVINE (1980) esse protozoário tem a seguinte posição sistemática:

- Reino: PROTISTA Haeckel, 1866
- Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817
- Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963
- Subfilo: MASTIGOPHORA Desing, 1866
- Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
- Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976
- Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
- Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905
- Gênero *Leishmania* Ross, 1903

Segundo LAINSON & SHAW (1987), as espécies de *Leishmania* das Américas pertencem a dois subgêneros de acordo com seu desenvolvimento no vetor: *Viannia* (aderem-se pelo flagelo às paredes do piloro e íleo) e *Leishmania* (apresentam desenvolvimento limitado no intestino médio do vetor), os quais se subdividem em várias espécies. Estudos posteriores realizados por THOMAZ-SOCCOL *et al.* (2003), baseados em técnicas bioquímicas por isoenzimas confirmam essa análise, o qual foi possível distinguir o dois subgêneros. No Brasil, os parasitos que causam Leishmaniose cutânea são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (Leishmania.) amazonenses* e *L. (V) lindenbergi*, sendo a espécie mais amplamente distribuída a *L. (V) braziliensis* (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Segundo a WHO (2011) as leishmanioses são divididas em formas clínicas de acordo com a definição abaixo:

1. Leishmaniose cutânea: produz lesões na pele, primordialmente no rosto, braços e pernas. Após a recuperação por tratamento com sucesso, a leishmaniose cutânea induz imunidade à reinfecção às espécies de *Leishmania* que causam a doença. A forma cutânea representa 50 a 75% dos casos.

2. Leishmaniose cutânea difusa: tem difícil tratamento devido às lesões disseminadas que se assemelham à hanseníase e não tem cura espontânea. Esta forma em particular está relacionada a uma deficiência específica do sistema imune.

3. Leishmaniose muco-cutânea: também conhecida como espúndia na América do Sul, causa lesões desfigurantes na face, destrói as membranas mucosas do nariz, boca e garganta.

4. Leishmaniose visceral: também conhecida como calazar, é caracterizada por febres irregulares, perda de peso, aumento do fígado e baço e, anemia. O período de incubação pode ter meses ou anos, e envolve órgãos internos.

## **2.2 Ciclo de Vida de *Leishmania* sp.**

O ciclo de vida de *Leishmania* varia de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasitos, vetores, reservatórios e hospedeiros. O ciclo requer a participação de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Durante seu ciclo biológico, este protozoário apresenta duas formas: amastigota e promastigota. A forma promastigota (22-25 $\mu$ m) é móvel, extracelular, flagelada, encontrada no trato intestinal do vetor e a forma amastigota (4-6  $\mu$ m) é arredondada ou ovalada, intracelular imóvel, que parasitam o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Figura 2).

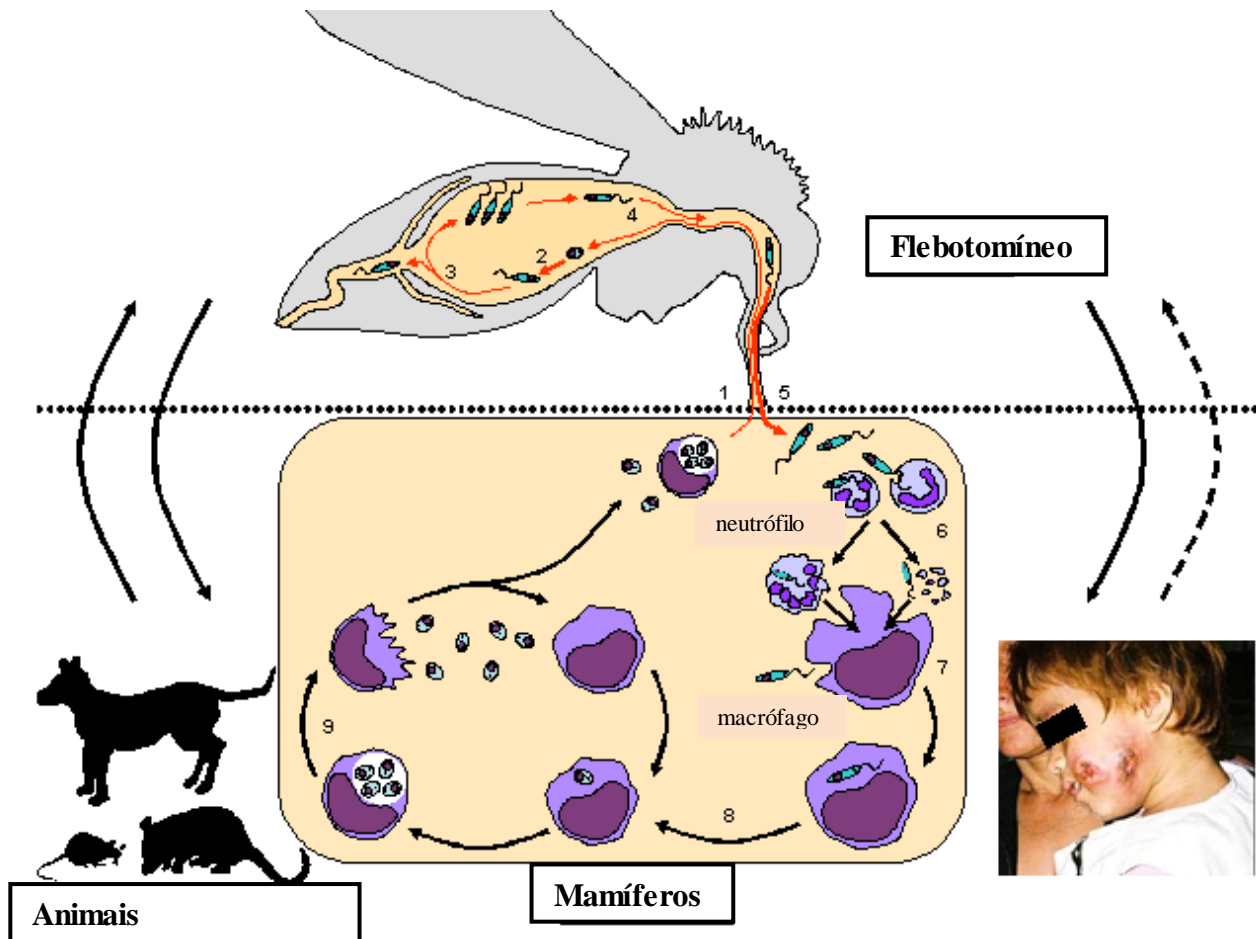
## **2.3 *Leishmania (Viannia) braziliensis***

A *L. (V) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e considerada como agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). É a mais

importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina. Esta espécie está amplamente distribuída em todo país e foi isolada de roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*) em Pernambuco, felídeos (*Felis catus*) no Rio de Janeiro, canídeos (*Canis familiaris*) no Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) nos estados do Ceará, Bahia e Rio de Janeiro. Embora o papel desempenhado por estes animais no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem definido, as evidências indicam, que apenas os roedores silvestres como prováveis reservatórios primários desta *Leishmania*. A ecoepidemiologia da LTA associada a *L. (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do país (MS, 2010).

A *L.(V.) braziliensis* é o patógeno mais comumente envolvidos com seus vetores flebotomíneos, sendo esses do gênero *Lutzomyia*. Apesar de várias espécies de *Leishmania* estarem envolvidas na manutenção da LTA no Brasil, a *L.(V.) braziliensis* é a espécie predominante como agente etiológico desta enfermidade (JONES *et al.*, 1987; RODRIGUES *et al.*, 2002), sendo a única espécie que causa a forma tardia da LTA, a mucocutânea, trazendo muita das vezes mutilações graves (REY, 2001). THOMAZ-SOCCOL *et al.* (2011), ao estudar pacientes com suspeita de leishmaniose mucocutânea em áreas endêmicas no Paraná, dos 21 pacientes analisados, 15 foram positivos para etiologia. Em 2009 foi relatada uma nova área endêmica de leishmaniose cutânea na região central do Paraná, o qual 100 pacientes foram diagnosticados, e os parasitos isolados foram identificados como *Leishmania (V.) braziliensis*, sendo esta a única espécie encontrada até o momento em todas as áreas endêmicas do estado (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).





**Figura 2.** Ciclo de vida de *Leishmania*. 1. O flebotomíneo ingere as formas amastigotas de *Leishmania* sp durante o repasto sanguíneo. 2. As amastigotas se transformam em formas promastigotas. 3. As promastigotas colonizam e se multiplicam no intestino do flebotomíneo. 4. As promastigotas infectantes (metacíclicas) migram para a parte anterior do intestino. 5. As promastigotas infectantes são transmitidas para um hospedeiro mamífero pela picada do flebotomíneo. 6. As promastigotas invadem neutrófilos dos hospedeiros. 7. Macrófagos são infectados pelas promastigotas diretamente ou pela fagocitose de neutrófilos infectados, ou infectados silenciosamente pelas promastigotas são liberados de neutrófilos apoptóticos. 8. As promastigotas se transformam em amastigotas. 9. As amastigotas multiplicam em células infectadas por divisão binária.

Nota: A maioria das espécies de *Leishmania* é mantida por um ciclo de transmissão de animais para animais e seres humanos são considerados hospedeiros acidentais (seta). No entanto, a transmissão antropométrica sem animais reservatórios também é relatado em algumas espécies de *Leishmania* (seta tracejada). FONTE: Kato *et al.* (2010).

## 2.4 Vetor

Os vetores da *Leishmania* são insetos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose são: *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1930), *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Coromyia) migonei* (França, 1920). Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetores por atenderem os critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. Cabe ressaltar que o papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino (RANGEL *et al.*, 2009; MS, 2010).

Segundo FORATTINI (1973) os flebotomíneos geralmente não ultrapassam 5 mm de comprimento, tendo pernas longas e delgadas, e o corpo densamente cerdoso (Figura 3). Têm como característica o vôo saltitante e a manutenção das asas abertas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Estes insetos têm por criadouros naturais determinados ecótopos que se caracterizam por oferecer proteção em relação à chuva e iluminação, e onde se acumula matéria orgânica em decomposição com considerável quantidade. Esta pode ser constituída por folhas, detritos, vegetais diversos, restos de artrópodes, fezes de animais e húmus em geral, tais como troncos e raízes de árvores, tocas de animais, solo florestal e folhas caídas, rochas, currais e chiqueiros.

Das aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos conhecidas no mundo, 60% são encontradas na Região Neotropical e no Brasil são conhecidas 229 espécies, sendo que 147 estão no ambiente silvestre e 82 em ambientes antrópicos (áreas cultivadas 33%, anexos dos animais domésticos 41% e paredes externas e internas de domicílios 26%) (RANGEL & LAINSON, 2003).

Existem espécies que se alimentam de sangue de vários hospedeiros, tem grande capacidade de dispersão, portanto ampla distribuição geográfica, como *Lutzomyia (N.) intermedia*, *Lu. (C.) migonei* e *Lu. (N.) whitmani*, que são encontradas em todas as regiões do Brasil. Outras, porém, são altamente específicas, menor poder de dispersão e dependentes de alguns ambientes. As preferências alimentares influenciam na dispersão das espécies, e algumas se restringem as áreas próximas de sua fonte de alimentação (AGUIAR & MEDEIROS, 2003).

*Lu. (N.) intermedia* foi descrita a partir de amostras coletadas na Fazenda Ouro Finas, no estado de Minas Gerais (MG), abundante em casas. Foi uma das primeiras espécies de flebotomíneos a ser descrita na Região Neotropical (RANGEL *et al.*, 2009).

Em áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis*, MARCONDES (1996) afirma que *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926), antes considerada como sinônimo de *Lu. (N.) intermedia*, pode ser distinguida desta, especialmente por características das espermatecas e de seus ductos, sendo possível considerar atualmente que *Lu. (N.) intermedia* s.s. e *Lu. neivai*. Além de dados morfométricos, MARCONDES (1997) utilizou DNA mitocondrial e, como resultado, reconheceu duas linhagens filogenéticas diferentes pertencentes ao complexo *Lutzomyia intermedia* - *Lu. intermedia* s.s. e *Lu. neivai* até então considerada sinonímia de *Lu. (N.) intermedia*. A relação entre as dimensões da estrutura genital e extragenital foi utilizada na distinção de machos de *Lu. intermedia* s.s. e *Lu. neivai*. Alto polimorfismo na espermateca, tanto no número de anelações, quanto na forma da cabeça foi observado em exemplares do complexo *Lu. (N.) intermedia* coletados em Minas Gerais por ANDRADE FILHO *et al.* (2003), que classificam como gênero *Nyssomyia* e redescrevem *Lu. (N.) intermedia* e *Lu. neivai* como espécies distintas baseados em dados morfológicos da fêmea e do macho em exemplares coletados em várias regiões do Brasil. ANDRADE FILHO *et al.* (2006) relatam que as duas espécies - *Lu. intermedia* e *Lu. neivai* – são morfologicamente muito próximas, mas apresentam grande variação em algumas estruturas, como o número de dentes horizontais no cibário e o número de anéis e forma da cabeça da espermateca.



**Figura 3.** Flebotomíneo fêmea realizando repasto sanguíneo.  
FONTE: Kato *et al.* (2010).

### **2.5 Infecção Natural dos Flebotomíneos por *Leishmania***

Várias espécies de flebotomíneos têm sido consideradas como vetores de *Leishmania*. Normalmente a espécie dominante em área endêmica é considerada vetor. Ao longo da história da leishmaniose a incriminação do vetor tem sido um problema devido à dificuldade de captura dos flebotomíneos. Os estudos de transmissão em laboratório permanecem difíceis, assim como o entendimento sobre os locais de procriação. Sem estas informações torna-se difícil determinar os fatores que definem a distribuição ecológica e geográfica de vários vetores e, conseqüentemente, da doença. ROSSI *et al.* (2008) afirmam que estudos sobre a prevalência de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos são importantes indicadores sobre a intensidade da transmissão do parasito.

Segundo RANGEL & LAINSON (2003) aproximadamente 230 espécies diferentes de flebotomíneos são encontrados no Brasil, mas somente 8% dessas têm sido implicadas como vetores da leishmaniose em diferentes regiões.

Para que haja a infecção do flebotomíneo pelas formas promastigotas de *Leishmania* estas formas têm que resistir, sobreviver e se multiplicar dentro do trato digestivo do inseto. Durante o processo de digestão, algumas espécies do protozoário sobrevivem e outras não resistem a este processo, determinando assim a competência vetorial dos flebotomíneos. De acordo com PIMENTA *et al.* (2003), a resistência das formas promastigotas às enzimas digestivas, após a excreção do alimento, é por conta da proteção conferida a essas formas pelo lipofosfoglicana (LPG), molécula encontrada na superfície do promastigota, protegendo-o da lise. As formas que são inoculadas no momento da picada e que sobrevivem no hospedeiro vertebrado são denominadas promastigotas metacíclicas.

A detecção do parasito no inseto geralmente é feita a partir do encontro das formas promastigotas (flageladas) no intestino médio do vetor, associado ou não ao cultivo *in vitro* ou *in vivo* do protozoário. A pesquisa de flagelados no tubo digestivo do vetor e a identificação da espécie do parasito, normalmente são realizadas por observação microscópica após dissecação ou tentativa de isolamento do agente proveniente de insetos em meios de cultura. Porém, fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que podem comprometer o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (PAIVA *et al.*, 2007).

Uma dificuldade encontrada nos estudos epidemiológicos é a necessidade de se examinar grande quantidade de exemplares, o que torna o custo elevado, pois há necessidade de se contar com técnicos especializados, submetidos a constantes ciclos de capacitação e reciclagem; além disso, é preciso lembrar as limitações da técnica de dissecação empregada na pesquisa de formas flageladas da *Leishmania* sp., que é extremamente demorada e pouco específica, já que a presença de flagelados de outras espécies parasitárias pode dar origem a resultados não conclusivos na microscopia (RODAS, 2006).

MICHALSKY *et al.* (2002), relatou que a taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e identificação correta da *Leishmania* infectante em uma determinada espécie de flebotomíneos é de primordial importância nos estudos

vetorial e epidemiológicos da leishmaniose e, que os métodos moleculares tem se mostrado eficientes para detecção de *Leishmania* em flebotomíneos independentemente da quantidade do parasito.

A PCR (Reação em cadeia pela polimerase) foi originalmente descrita por SAIKI *et al.* (1985) e desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. É uma técnica com alta sensibilidade e aplicabilidade. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material.

De acordo com SAVANI *et al.* (2009) através da utilização do método convencional (dissecção) para investigar a infecção natural por flagelados, têm frequentemente encontrado baixa taxa de fêmeas de flebotomíneos parasitadas. No Brasil e outros países sul-americanos nas áreas endêmicas da leishmaniose, os valores variam de 0,06% para 0,47% enquanto quando são utilizadas técnicas de biologia molecular as taxas são de 0,8 a 6,0%.

ROSSI *et al.* (2008) utilizando o método de dissecção, encontrou 1,4% de fêmeas *Phlebotomus perniciosus* infectados com promastigotas, no entanto quando utilizou PCR, a taxa global de DNA de *Leishmania* positivo foi de 47,2%, evidenciado que a positividade foi surpreendentemente alta quando comparados com os resultados de microscopia, mostrando que a técnica é sensível.

A identificação correta das espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas pode confirmar o papel destes na transmissão do parasito em dada região (PAIVA *et al.*, 2007). A indicação que pequenos setores dentro de áreas maiores, consideradas como endêmicas, podem ter uma frequência de flebotomíneos maior e sua associação com a doença humana é indicativa de uma distribuição espacial da doença e deve ser considerada no planejamento das estratégias de controle (MIRANDA *et al.*, 2002).

Estudos recentes utilizando a técnica da PCR, têm sido realizados para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp. (DOUGALL *et al.*, 2011; MARCELINO *et al.*, 2011; MICHALSKY *et al.*, 2011; PITA-PEREIRA *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2011; BACHA *et al.*, 2011). Segundo esses autores os resultados

utilizando a PCR independentem da carga parasitária das amostras, sendo um instrumento de grande sensibilidade na detecção de *Leishmania*.

A técnica de PCR, devidamente padronizada e aplicada de forma correta, constitui uma ferramenta importante nos estudos epidemiológicos para identificação de flebotomíneos infectados e determinação das taxas de infecção dos mesmos nas áreas endêmicas para leishmaniose.

### 2.5.1 Métodos de Extração de DNA

A técnica de extrair ácidos nucleicos de células em quantidade, pureza e integridade suficientes é uma fase essencial na prática da biologia molecular, os quais dependem de muitos fatores e têm uma grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicada, como por exemplo, na PCR (WALKER *et al.*, 1999).

São várias as técnicas descritas para extração de ácidos nucleicos para flebotomíneos, com substâncias e estratégias diferentes para sua obtenção. AREZ *et al.* (2000) observaram melhores resultados utilizando o Triton X 100 1% e DTT ou Chelex. RODAS (2006) optou pelo o uso do fenol/clorofórmio para a extração e amplificação de DNA, tanto do fragmento de 370pb de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* como do fragmento de 120pb da *Leishmania* sp. O autor menciona que foi preciso diluir algumas amostras para minimizar o efeito de inibição, e justifica seu uso devido ao menor custo.

FERNANDES *et al.* (2004) comparou três métodos de extração DNA a partir de tecido fixado, com 2 kits comerciais e um método utilizado por BANERJEE *et al.* (1995), e concluiu que o ultimo protocolo citado apresentou vantagem em relação aos demais por ser mais simples e rápido e por dispensar uso de substâncias orgânicas. SIMONATO *et al.* (2007) compararam o Chelex 100® (BioRad) com o kit QIAamp DNA minikit® (Qiagen) e concluíram que ambos apresentaram desempenho semelhante, revelando potencial similar nas práticas de Biologia Molecular.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a infecção natural de *Leishmania* sp. em *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* s.l., capturados no domicílio, peridomicílio e mata, em área endêmica de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana, no município de Adrianópolis, Paraná.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Comparar técnicas de extração de DNA para *Leishmania (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) intermedia* s.l.:
- Otimizar a técnica da PCR para detecção de DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) intermedia* s.l.;
- Testar a sensibilidade da técnica de PCR na detecção de DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) intermedia* s.l.;
- Determinar a taxa de infecção natural de *Leishmania* sp. pela técnica de reação em cadeia da polimerase em *Lutzomyia (N.) intermedia* s.l. capturados no domicílio, mata e peridomicílio.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Descrição da Área de Coleta dos Flebotomíneos

A área de pesquisa para o presente estudo está localizada na região do Vale do Ribeira, no sul do estado de São Paulo e ao leste do estado do Paraná. Recebe este nome em função da bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape e ao Complexo Estuarino Lagunar de Iguape, Cananéia e Paranaguá. Sua área de 2.830.666 hectares abriga uma população de 481.224 habitantes e inclui integralmente a área de 31 municípios (9 paranaenses e 22 paulistas). Existem ainda outros 21 municípios no estado Paraná e outros 18 municípios no estado de São Paulo, que estão parcialmente inseridos na bacia do Ribeira. Apresenta clima subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes com tendência de concentração de chuvas (temperatura média superior a 22°C), e invernos com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), sem estação seca definida. Atualmente, a cobertura vegetal original está quase totalmente desaparecida, sendo substituída pela vegetação resultante da ação do homem sobre a vegetação natural como bananais, agricultura de subsistência como milho, feijão, mandioca, reflorestamento de pinus, pecuária e cítricos (PROGRAMA VALE DO RIBEIRA, 2010).

As coletas foram realizadas no município de Adrianópolis, área endêmica para leishmaniose tegumentar americana, situado no Vale da Ribeira a Sudeste do Estado. Pertence à Região Metropolitana de Curitiba, com área de 1.349,338 km<sup>2</sup>, população de 6.374 habitantes e uma altitude 154 metros (Figura 4).



**Figura 4** - Mapa de localização do Município de Adrianópolis (área em vermelho).

FONTE: ABREU (2006)

#### **4.2 Coleta dos Flebotomíneos**

As coletas foram realizadas mensalmente no período de julho de 2010 a junho de 2011. Para a captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas CDC (“Communicable Diseases Center”) (Figura 5) e instaladas no período de 18h às 06h nos ambientes de domicílio, peridomicílio e mata. Após as coletas, os flebotomíneos foram acondicionados em gaiolas apropriadas para transporte até o laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

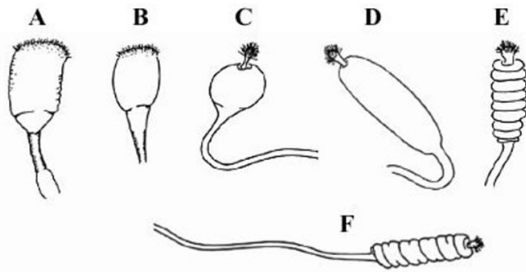


**Figura 5** - Armadilha CDC instalada em peridomicílio.

### **4.3 Identificação dos Flebotomíneos**

No Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná os flebotomíneos foram anestesiados com clorofórmio, e com auxílio de microscópio estereoscópico, separados por sexo. Em seguida, as fêmeas e machos foram dissecados para identificação específica. Nas fêmeas foi observada a morfologia da espermateca em lâmina com solução salina 0,9% esterilizadas em microscópio de luz, com aumento de 400 vezes; nos machos foram utilizadas as características das estruturas da genitália e utilizado o critério de classificação de FORATTINI (1973) (Figura 6 e 7). Após a identificação dos espécimes, o corpo do flebotomíneo foi armazenado em tubos de 0,6 mL (tipo *ependorf*) contendo etanol 80%. Os flebotomíneos não identificados a fresco foram dissecadas as partes finais do abdômen e acondicionadas em placas contendo KOH 20% por um período de 12 h, até clarificação adequada para identificação.

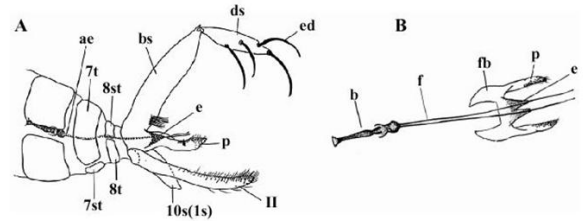
• Fêmea



**Figura 6** - Estrutura geral e tipos morfológicos da porção distal das espermatecas de flebotomíneos. **A)** *Lutzomyia fischeri*; **B)** *L. pessoai*; **C)** *L. edwardsi*; **D)** *L. shannoni*; **E)** *L. intermedia*; **F)** *L. longipalpis*.

FONTE: FORATTINI (1973).

• Macho



**Figura 7** - Genitália masculina de flebotomíneo. **A)** aspecto geral; **B)** aparelho espiracular; **ae)** aparelho espiracular; **b)** bomba ejaculadora; **bs)** basistilo; **ds)** dististilo; **e)** edeago; **ed)** espinho do dististilo; **f)** filamentos ejaculadores; **fb)** falobase; **II)** lobo lateral; **1s)** lamela submediana; **7st)** sétimo esternito; **7t)** sétimo tergito; **8st)** oitavo esternito  
FONTE: FORATTINI (1973).

#### 4.4 Procedimentos para Análise da Sensibilidade da PCR na Detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) intermedia*

Para análise da sensibilidade da técnica de PCR foram utilizadas diluições seriadas das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e grupos de machos da espécie *Lu. (N.) intermedia*.

##### 4.4.1 Obtenção das Formas Promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

As cepas referências utilizadas são as recomendadas pela OMS: *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Após o descongelamento as cepas foram repicadas por 3 semanas em meios bifásicos (NNN - McNeal, Novy) e mantidas em estufa a 24 °C. Em seguida os parasitos foram transferidos para tubo “Falcon” 20 mL de meio RPMI

suplementado com 15% de soro fetal bovino. Para obtenção da biomassa de *L. (V.) braziliensis*, após uma semana, transferiu-se o conteúdo para garrafa de cultivo de 100 mL com meio RPMI e antibiótico.

Os parasitos em fase logarítmica de crescimento foram colocados em uma diluição com 10 µL da cultura e 90 µL de meio RPMI. Uma alíquota de aproximadamente 20 µL foi colocada em câmara de Neubauer para contagem dos parasitos. A partir dessa contagem foram preparadas diluições seriadas com 10, 50 e 100 promastigotas.

#### **4.4.2 Formação de grupos de Flebotomíneos Machos e Formas Promastigotas de *L.(V.) braziliensis* para Avaliar a Sensibilidade da PCR**

Após lavagem inicial com água milli-Q esterilizada, para retirar os resíduos de álcool 80 %, os machos de *Lu. (N.) intermedia* foram transferidos para tubos de 2 mL (tipo *ependorf*). Foram formados 4 grupos de flebotomíneos com 1, 3, 6 e 10 exemplares e em cada foi adicionado 10, 50 e 100 formas promastigotas (Tabela 3).

**TABELA 3** – GRUPOS FORMADOS DE ACORDO COM O NÚMERO DE FLEBOTOMÍNEOS MACHOS E FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* ADICIONADAS PARA TESTE DE SENSIBILIDADE DA PCR.

	<b>Nº de Flebotomíneos</b>	<b>Nº de Promastigotas</b>
A	1	10
	1	50
	1	100
B	3	10
	3	50
	3	100
C	6	10
	6	50
	6	100
D	10	10
	10	50
	10	100

#### 4.4.3 Extração de DNA

Foram utilizados três diferentes métodos de extração de DNA de *L.(V.) braziliensis*: método fenol/clorofórmio de acordo com o protocolo do laboratório de Parasitologia Molecular UFPR, pelo kit comercial ChargeSwitch® e pelo método de Chelex 100 (BioRad) (LOXDALE & LUSHAI, 1998).

##### 4.4.3.1 Extração de DNA Realizada com Fenol-Clorofórmio

Os flebotomíneos foram macerados em tubos de 1,5 mL com 200 µL de água milli-Q esterilizada, com auxílio de pistilo plástico acoplado a um adaptador motor. Na extração realizada com fenol/clorofórmio a primeira fase consistiu na lise e eliminação do RNA, adicionando 1 mL de PBS (pH 7,4) e submetido à agitação. Centrifugou-se a

3500g por 15 min a 4°C. Em seguida, foi retirado o máximo de sobrenadante, descartando posteriormente. Foi adicionado 450 µL de tampão de lise, 50 µL de SDS 10 % e 6 µL de proteinase K e submetida a amostra à agitação no vortex. Deixou-se em banho-maria a 56°C por 5 h. Após, foi inativada a proteinase K por 5 min a 90°C, e adicionado 2 µL de RNase (20mg/ml), agitado e deixado em banho-maria a 37°C por 2h. A fase de desproteínização foi realizada em capela de exaustão, sendo adicionando 500 µL de fenol-clorofórmio e homogenizado por 10 min. Foi centrifugado a 12000g por 5 min a 20°C e em seguida foi retirado o máximo de sobrenadante e transferido para outro tubo, repetindo os dois últimos passos com fenol-clorofórmio. Logo após adicionou-se 500 µL de clorofórmio, homogenizou-se lentamente por 10 min, foi centrifugado a 9000g por 5 min a 20°C, retirou-se o sobrenadante transferindo para outro tubo. Após procedeu-se com a fase de precipitação do DNA, adicionando 600 µL de etanol absoluto, homogeneizando delicadamente, adicionando-se 30 µL de acetato de sódio 3M (10%) e nova homogeneização. A solução com DNA e foi mantido -20°C (*overnight*). Após foi centrifugado a 12000g por 30 min a 4°C, e descartado o sobrenadante por inversão, adicionou-se 300 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 12000g por 15 min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado por inversão e deixado secar em estufa a 37°C. Após a secagem foi homogeneizado o *pellet* em 100 µL de TE. As amostras foram acondicionadas a -20°C.

#### **4.4.3.2 Extração de DNA Realizada com Kit Comercial ChargeSwitch®**

Os flebotomíneos foram macerados em tubos de 1,5 mL com 200 µL de água milli-Q esterilizada, com auxílio de pistilo plástico acoplado a um adaptador motor. Na extração realizada com o kit comercial, a primeira etapa compreendeu na preparação da amostra, para rompimento da membrana celular. Foi acrescentado 1 mL de tampão de lise na amostra, sendo submetido à 5 ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (55°C). Em seguida foi adicionada 20 µL de proteinase K, agitado brevemente e incubado as amostras a 55°C por 2 h. Acrescentou 2 µL de RNase A, ocorreu homogeneização e foi incubado em temperatura ambiente por 2 min. A

segunda etapa compreendeu a obtenção do DNA pela ligação magnética. As esferas magnéticas foram suspensas no agitador, acrescentou-se 120  $\mu\text{L}$  da amostra e homogeneizou-se. Em seguida foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de tampão de purificação, ocorreu homogeneização. Após foi posicionado os tubos na estante magnética por 2 min e ocorreu descarte do sobrenadante. A terceira etapa foi lavagem do DNA com os tubos fora da estante magnética. Nessa etapa acrescentou-se 1 mL de tampão de lavagem. Após foi homogeneizado para que as esferas magnéticas fossem suspensas. Os tubos foram posicionados na estante magnética por 1 min para clareamento das amostras. Em seguida, o sobrenadante foi removido. A etapa de lavagem do DNA foi repetida por duas vezes. A quarta etapa compreendeu a eluição do DNA. Os tubos foram removidos da estante magnética, foi acrescentado 250  $\mu\text{L}$  do tampão de eluição, ocorreu homogeneização. O material foi incubado a 55°C por 5 min, após foi posicionada na estante por 2 min. Em seguida ocorreu a remoção da solução eluída contendo DNA purificado transferindo para tubo de 600  $\mu\text{L}$ , que foram acondicionadas a -20°C.

#### **4.4.3.3 Extração de DNA Realizada com Chelex 100 (BioRad)**

Nesse método, os flebotomíneos foram macerados em 300 $\mu\text{l}$  de Chelex 5% (5 gramas de soluto em 100 mL de água milli-Q esterilizada), dentro de microtubos esterilizados de 1,5 mL. Em seguida a amostra foi agitada em 5 ciclos de 1 min e centrifugadas por 1 min a 13000g, após foram incubadas em banho-maria por 30 min a 90°C e submetidas à agitação. Em seguida foram centrifugadas por 1 min a 13000g, retirado sobrenadante, transferido para tubos de 600  $\mu\text{L}$  e foram acondicionadas a -20°C.



#### 4.4.4 Amplificação do DNA de *Leishmania* sp.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi otimizada com um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 2,5  $\mu$ L tampão (10x); 1,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,9  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador (10  $\mu$ M); 0,25  $\mu$ L de dNTP (mM); 0,3  $\mu$ L de Taq DNA-polimerase (5 U/ $\mu$ l); 14,15  $\mu$ L de água; 5  $\mu$ L de DNA. As condições para amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial ciclo 1 (1x) a 94°C por 3 min; ciclo 2 (30x) a 94°C por 1 min; 50°C por 1 min e extensão final a 72°C por 1 min. A detecção de DNA de *Leishmania* foi realizada pela amplificação de uma região conservada 120 pb mkDNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores *Forward*: 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' e *Reverse*: 5' -GGCCCACTAT ATTACACCAACCCC-3' (ROCHA *et al.*, 2010). A quantificação do DNA foi realizada em NanoDrop 3300.

#### 4.4.5 Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação realizados pela PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (tris base, ácido bórico e EDTA 0,5 M pH 8,3) e voltagem de 60 V durante 3 h. O marcador de tamanho molecular 100 kb Plus DNA Ladder Gibco, foi utilizado como padrão. Os géis obtidos na eletroforese foram corados em brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml) por aproximadamente 30 min e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente, o material foi fotodocumentado e analisado.

#### **4.5 Detecção de DNA de *Leishmania* sp. em *Lu. (N.) intermedia* s.l. naturalmente Infectada**

Para detecção de *Lu. (N.) intermedia* naturalmente infectada por *Leishmania* sp., 1014 fêmeas foram divididas em 133 *pools* de 1 a 10 flebotomíneos, dando preferência àquelas que estavam ingurgitadas. A extração do DNA foi realizada com Chelex 100 (BioRad) conforme já descrito e, foi realizada a PCR utilizando *L. (V.) braziliensis* como controle positivo e flebotomíneo macho como controle negativo. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese.

##### **4.5.1 Cálculo da Taxa Mínima de Infecção**

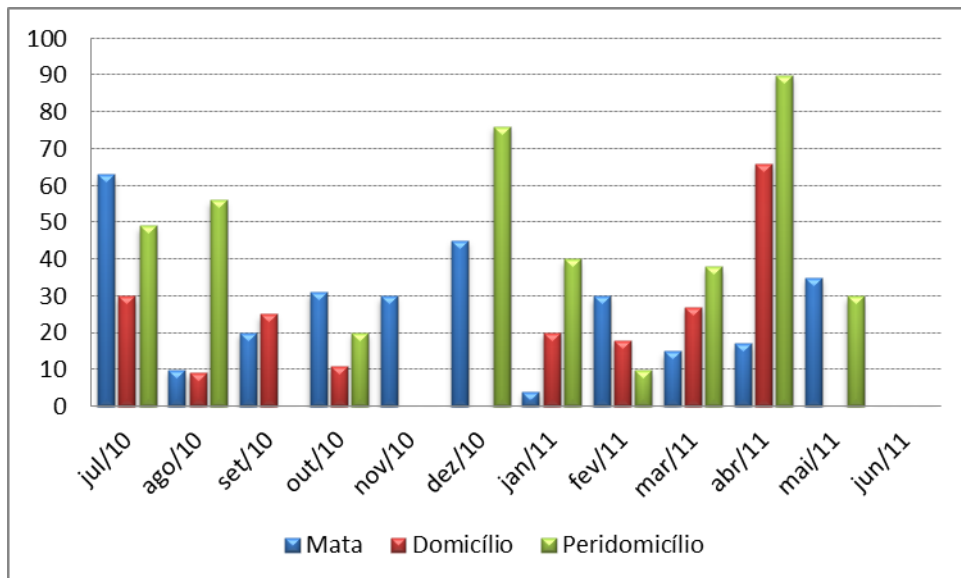
A taxa mínima de infecção dos flebotomíneos, foi calculada utilizando a fórmula: taxa mínima (TM) = número de grupos positivos x 100/número total de insetos (PAIVA *et al.*, 2007). Considerando que em cada *pool* positivo (grupos) há pelos menos uma fêmea infectada.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Flebotomíneos Coletados

No período de julho de 2010 a maio de 2011 foram coletadas 2033 fêmeas. No mês de junho não foi coletado nenhum exemplar devido as baixas temperaturas (Gráfico 1). As espécies foram identificadas como *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (PINTO, 1926) (4 exemplares) e *Lu.(N.) intermedia s.l.* (2029 exemplares). A quantidade de anéis da espermateca encontrados em *Lu. (N.) intermedia s.l.* variou de 6 a 13. Neste trabalho consideramos a espécie como *Lu. (N.) intermedia s.l* que representa o complexo *Lu.(N.) intermedia* (MARCONDES, 1996 e 1997; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2003 e 2006).

No período de julho a outubro de 2010 foram identificados 737 machos da espécie como *Lu. (N.) intermedia s.l* Os machos foram utilizados para realização do teste de sensibilidade e como controle negativo da PCR.

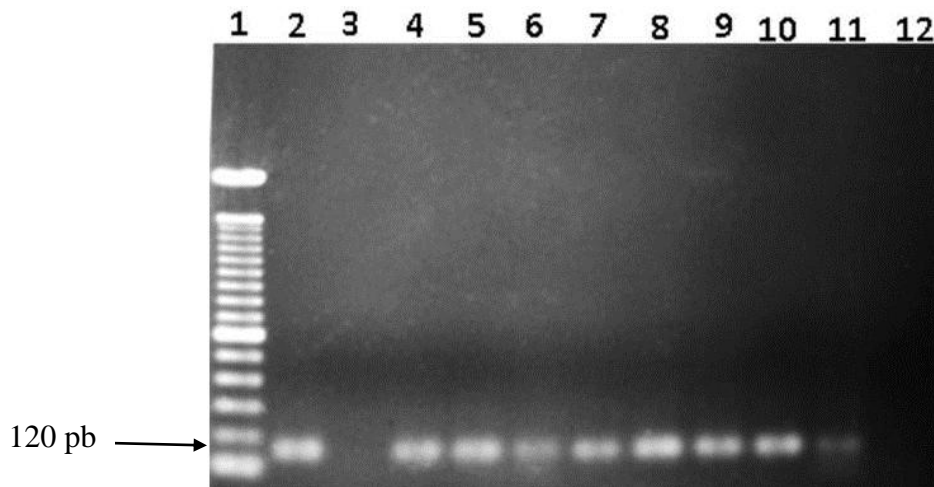


**GRÁFICO 1** – NÚMERO MENSAL DE FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM DIFERENTES ECÓTIPOS.

## 5.2 Avaliação dos Métodos de Extração de DNA e sensibilidade da PCR para Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### 5.2.1 Grupo A

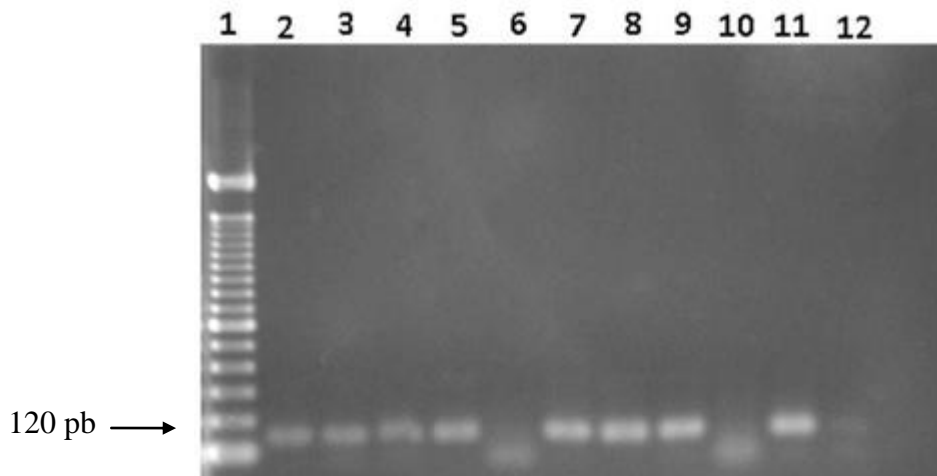
O grupo A utilizou 1 único flebotomíneo macho com grupos de 10, 50 e 100 formas promastigotas. Somente na extração realizada com fenol-clorofórmio não houve amplificação do DNA, ou seja não apareceu banda relacionada ao tamanho específico para *Leishmania*. quando utilizadas 10 promastigotas (Figura 5, colunas 2, 3 e 4). Com 50 promastigotas, o fragmento obtido pela extração com fenol-clorofórmio, mostrou banda mais fraca que as demais amostras extraídas com o kit comercial e com Chelex (Figura 8, colunas 5,6 e 7). Os 3 métodos de extração utilizados se mostraram equivalentes quando foram utilizadas 100 promastigotas (Figura 5, colunas 8, 9 e 10).



**FIGURA 8** - Teste de sensibilidade da PCR para detecção de *L. (V.) braziliensis*, realizado com 1 flebotomíneo macho. 1: marcador molecular 100 pb; 2: DNA com 10 p extraída com Ch; 3: DNA com 10 p extraída com F/C; 4:- DNA com 10 p extraída com CS; 5 - DNA com 50 p extraída com Ch; 6 - DNA com 50 p extraída com F/C; 7 - DNA com 50 p extraída com CS; 8 - DNA com 100 p extraída com Ch; 9 - DNA com 100 p extraída com F/C; 10 - DNA com 100 p extraída com CS; 11 – Controle positivo utilizando *L. braziliensis*; 12 – Controle negativo utilizando FI Machos. Legenda: p: promastigota; pb: pares de bases; Ch: chelex; F/C: Fenol/Clorofórmio; CS: ChargeSwitch®; FI: Flebotomíneos

### 5.2.2 Grupo B

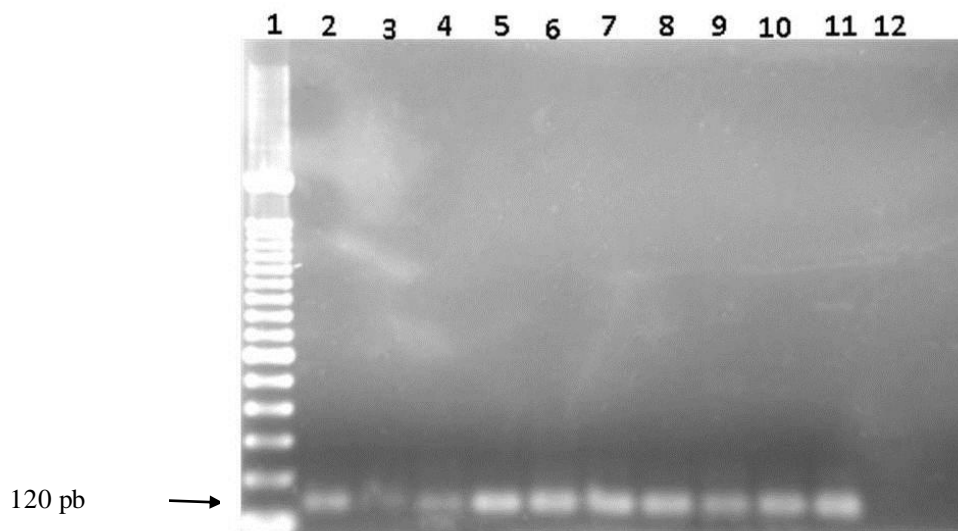
No grupo B foram agrupados 3 flebotomíneos machos com 10, 50 e 100 formas promastigotas. Com 10 promastigotas, apareceram bandas um pouco mais fracas que as demais (Figura 9, colunas 2,3 e 4). Com 50 promastigotas somente na extração realizada com fenol-clorofórmio não houve amplificação do DNA (Figura 6, colunas 5,6 e 7). Com 100 promastigotas não houve amplificação de DNA na extração realizada com ChargeSwitch® (Figura 9, colunas 8,9 e 10).



**FIGURA 9** - Teste de sensibilidade da PCR para detecção de *L. (V.) braziliensis*, realizado com 3 flebotomíneos machos. 1 – Marcador molecular 100 pb; 2 – DNA com 10 p extraída com Ch; 3 - DNA com 10 p extraída com F/C; 4 - DNA com 10 p extraída com CS; 5 - DNA com 50 p extraída com Ch; 6 - DNA com 50 p extraída com F/C; 7 - DNA com 50 p extraída com CS; 8 - DNA com 100 p extraída com Ch; 9 - DNA com 100 p extraída com F/C; 10 - DNA com 100 p extraída com CS; 11 – Controle positivo utilizando *L. braziliensis*; 12 – Controle negativo utilizando FI Machos. Legenda: p: promastigota; pb: pares de bases; Ch: chelex; F/C: Fenol/Clorofórmio; CS: ChargeSwitch®; FI: Flebotomíneos

### 5.2.3 Grupo C

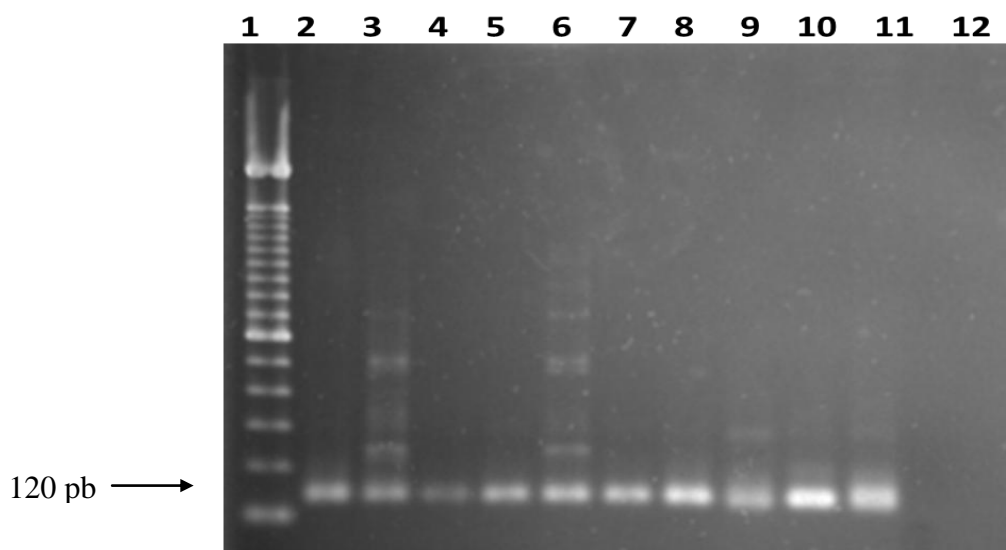
No grupo C foram agrupados 6 flebotomíneos machos com 10, 50 e 100 formas promastigotas. Com 10 promastigotas, na extração realizada com fenol-clorofórmio e com o Kit comercial (Charge Switch) a amplificação foi mais fraca que o Chelex (Figura 10, colunas 2,3 e 4). Os três métodos de extração utilizados amplificaram quando utilizadas 50 e 100 promastigotas (Figura 10, colunas 5, 6, 7, 9,10).



**FIGURA 10** - Teste de sensibilidade da PCR para detecção de *L. (V.) braziliensis*, realizado com 6 flebotomíneos machos. 1 – Marcador molecular 100 pb; 2 –DNA com 10 p extraída com Ch; 3 - DNA com 10 p extraída com F/C; 4 - DNA com 10 p extraída com CS; 5 - DNA com 50 p extraída com Ch; 6 - DNA com 50 p extraída com F/C; 7 - DNA com 50 p extraída com CS; 8 - DNA com 100 p extraída com Ch; 9 - DNA com 100 p extraída com F/C; 10 - DNA com 100 p extraída com CS; 11 – Controle positivo utilizando *L. braziliensis*; 12 – Controle negativo utilizando FI Machos. Legenda: p: promastigota; pb: pares de bases; Ch: chelex; F/C: Fenol/Clorofórmio; CS: Charge Switch®; FI: Flebotomíneos

### 5.2.4 Grupo D

No grupo D foram agrupados 10 flebotomíneos machos com 10, 50 e 100 formas promastigotas. Na extração feita com fenol-clorofórmio ocorreu o aparecimento de bandas inespecíficas nas colunas 3 e 6 (Figura 11), quando utilizadas 10 e 50 promastigotas respectivamente. Com 100 promastigotas as extrações realizadas com Kit comercial (Charge Switch) e o Chelex se mostraram equivalentes (Figura 11, colunas 8 e 10).



**FIGURA 11** - Teste de sensibilidade da PCR para detecção de *L. (V.) braziliensis*, realizado com 10 flebotomíneos machos. 1 – Marcador molecular 100 pb; 2 – DNA com 10 p extraída com Ch; 3 - DNA com 10 p extraída com F/C; 4 - DNA com 10 p extraída com CS; 5 - DNA com 50 p extraída com Ch; 6 - DNA com 50 p extraída com F/C; 7 - DNA com 50 p extraída com CS; 8 - DNA com 100 p extraída com Ch; 9 - DNA com 100 p extraída com F/C; 10 – DNA com 100 p extraída com C/S; 11 - Controle positivo utilizando *L. braziliensis* ; 12 – Controle negativo utilizando FI Machos. Legenda: p: promastigota; pb: pares de bases; Ch: chelex; F/C: Fenol/Clorofórmio; CS: Charge Switch®; FI: Flebotomíneos.

O método de extração que se mostrou pouco satisfatório foi o fenol/clorofórmio, pois em algumas amplificações foi possível verificar o aparecimento de bandas inespecíficas, em outras as bandas foram mais fracas ou não amplificaram. Também foi possível verificar que o fenol/clorofórmio mostrou uma concentração de DNA inferior

aos outros métodos como mostra a tabela 4. As extrações com Chelex 100 (BioRad) e kit ChargeSwitch® foram satisfatórias para a realização da PCR sendo possível detectar apenas 10 promastigotas em *pools* de 1, 3, 6 e 10 flebotomíneos. Por isso para a detecção de DNA de *Leishmania* sp. em *L. (N.) intermedia* foram usados *pools* com 1 a 10 flebotomíneos com o método de extração de Chelex.

**TABELA 4.** QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR NanoDrop 3300, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NOS GRUPOS DE FLEBOTOMÍNEOS

Método de Extração	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
<b>Chelex 100 (BioRad)</b>	32 à 122,8	13,4 à 51,5	35 à 273,7	41,5 à 131,3
<b>Fenol/ Clorofórmio</b>	2,9 à 4,4	2,2 à 3,4	3,9 à 5,4	2,3 à 3,0
<b>Kit ChargeSwitch®</b>	6,6 à 7,3	11,8 à 124,7	20,4 à 32,4	17,6 à 44,7

Valores expressos em ng/μL.

**TABELA 5.** COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE REAGENTES UTILIZADOS, TEMPO DE EXTRAÇÃO E O CUSTO POR AMOSTRA.

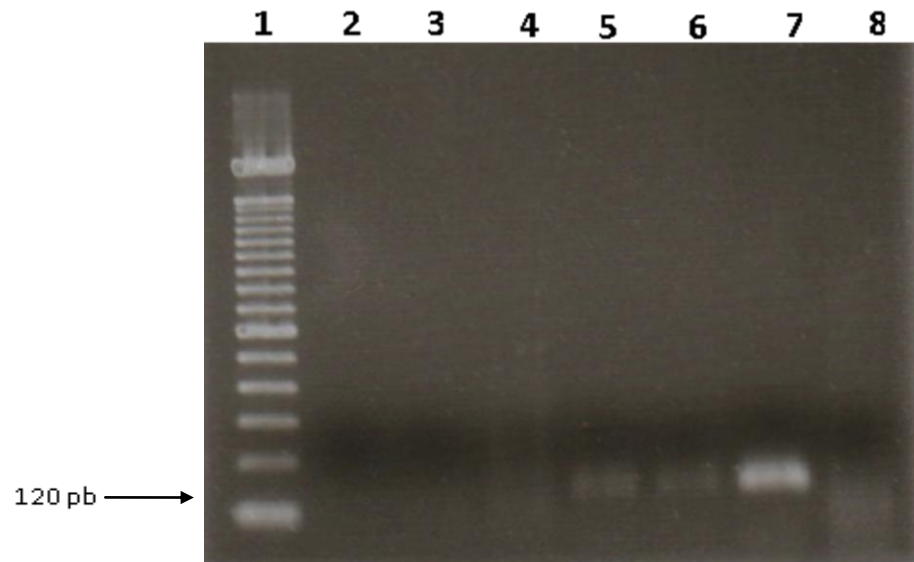
Método de Extração	Número de Reagentes	Tempo	Valor por amostra
<b>Chelex 100 (BioRad)</b>	1	1 hora	R\$ 0,23
<b>Fenol-Clorofórmio</b>	11	3 dias	R\$ 4,24
<b>Kit ChargeSwitch®</b>	7	6 horas	R\$15,28

### 5.3 Detecção do DNA de *Leishmania* sp. em Flebotomíneos utilizando a Técnica de PCR

No total, 1014 fêmeas foram submetidas para extração de DNA seguida de amplificação por PCR. Dos 133 *pools* analisados por PCR, 2 *pools* (P5 e P6) foram positivos (anexo 1 e Figura 9), sendo que em cada *pool* continha 10 fêmeas. As fêmeas encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania* sp. pertencem à espécie *Lu. (N.)*



*intermedia*, e foram coletadas na mata no mês de julho de 2010 (Anexo 1). A taxa mínima de infecção foi de 0,2% de fêmeas infectadas por *Leishmania* sp.



**FIGURA 12** - Amplificações de DNA de fêmeas da espécie *Lu. (N.) intermedia* naturalmente infectada por *Leishmania* sp. 1- Marcador molecular 100 pb; 2 a 4: pool (P2, P3 e P4); 5: pool 5 (P5) de 10 fêmeas e 6: pool 6 (P6) de 10 fêmeas; 7: controle positivo utilizando *Leishmania* sp.; 8: controle negativo utilizando machos.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada análise da sensibilidade da PCR para detecção de *L. (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) intermedia* s.l. As amplificações variaram mais em relação ao método de extração do que em relação à quantidade de flebotomíneos e formas promastigotas utilizadas. O produto amplificado para *Leishmania* sp. (120 pb) foi observado em amostras contendo 10 promastigotas e verificado que mesmo nos grupos que haviam 10 flebotomíneos ocorreu amplificação do DNA.

STRAUSS *et al.* (2004) afirmaram que a PCR é considerada um método sensível na detecção de *Leishmania*, independente da escassez de parasitos no material amostrado. No entanto, PAIVA *et al.*, (2007) descreveram que os insetos possuem em seus tecidos, inibidores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR, contudo foi verificado neste trabalho que mesmo em *pools* com 10 flebotomíneos houve amplificação pelos 3 métodos de extração empregados.

Por isso, a escolha adequada do método para extração de DNA é de extrema importância, uma vez que o DNA deve ter quantidade suficiente e livre de impurezas. Foram comparados três métodos de extração, considerando a qualidade do DNA, tempo para realização das etapas e o custo.

As extrações de DNA utilizando fenol/clorofórmio levaram até três dias para serem executadas. Apesar do baixo custo esta técnica não se mostrou a mais adequada nos testes realizados, uma vez que em alguns momentos não foi eficiente para a amplificação, em outros ocorreu o aparecimento de bandas inespecíficas na PCR. Esse fato foi discutido por PAIVA *et al.* (2007), que afirmam que durante o processo de extração do DNA o método que incluiu passagens em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ocasionou perdas do DNA, perda de sensibilidade na amplificação, gerando bandas inespecíficas.

O Kit ChargeSwitch® se mostrou uma técnica eficiente para extração de DNA. Inclusive as amostras que foram armazenadas por um período superior a 6 meses com congelamento e descongelamento por várias vezes, o DNA se mostrou eficiente no uso para PCR. ROMERO *et al.* (2001) avaliaram a sensibilidade da PCR para o diagnóstico

da leishmaniose utilizando um kit comercial para extração do DNA, o qual mostrou sensibilidade de 100% para PCR.

A extração com Chelex apresentou resultados satisfatórios com relação a sensibilidade e positividade na amplificação da PCR, com a obtenção de DNA de boa qualidade. Esse método é de fácil execução, com procedimentos rápidos que levam aproximadamente 1 hora para realização e de baixo custo. CABRERA *et al.* (2002) ao utilizar Chelex para extração de DNA em flebotomíneos também afirmaram que este método é prático e eficiente frente a outros protocolos utilizados para extração.

Foi observado, entretanto, que as amostras extraídas com Chelex apresentaram perda na concentração do DNA, quando submetidas a sucessivos períodos de congelamento e descongelamento. Apesar disso, as amplificações ocorriam. Talvez uma estratégia para minimizar esse problema seja fazer pequenas alíquotas do DNA extraído na rotina do laboratório.

Apesar dos bons resultados obtidos com o Kit ChargeSwitch®, comparativamente o seu custo é mais elevado em relação as outras duas extrações (Fenol/clorofórmio e Chelex), além do tempo de extração ser 6 vezes mais se comparado ao Chelex (Tabela 6).

No presente trabalho foram realizadas coletas durante 12 meses, apesar de no mês de junho não ter sido coletado nenhum exemplar devido às baixas temperaturas. Foi possível verificar que em temperaturas abaixo de 10°C, ocorreu uma menor captura de flebotomíneos. No mês de julho de 2010 foram encontrados 2 *pools* positivos para *Leishmania* sp., realizados com 10 flebotomíneos em cada *pool* da espécie *L. (N.) intermedia*, sendo que essa coleta foi realizadas na mata. Segundo KILLICK-KENDRICK & WARD (1981) para que um flebotomíneo seja considerado como vetor da *Leishmania*, é necessário que este seja encontrado naturalmente infectado.

De acordo com GONÇALVES (2010) a espécie prevalente no local de estudo é a *Lu. (N.) intermedia*. No entanto, a fauna flebotomínica na região de Adrianópolis é composta por pelo menos mais 3 espécies: *Lu. pessoai*, *Lu. fischeri* e *Lu. migonei*.

Estudos realizados na década de oitenta no Vale do Ribeira, já afirmavam que a única espécie que mostra uma densidade epidemiológica significativa para a

transmissão de *Leishmania* é a *Lu. (N.) intermedia* (GOMES *et al.*, 1986). SILVA & GOMES (2001) afirmaram também que a suscetibilidade para *L. (V.) braziliensis*, associada aos indicadores epidemiológicos, concorre para a suspeita do papel vetorial de *Lu. (N.) intermedia* nesta região. CASTRO *et al.* (2005) afirmaram que no Vale do Ribeira, a espécie *Lu. (N.) intermedia s.l.* pela alta densidade é considerada principal responsável pela transmissão de *L. (V.) braziliensis*. Segundo os autores, a transmissão ocorre principalmente no momento em que a população humana entra na mata para realizar atividades de caça ou pesca. Essa afirmação corrobora com o resultado deste trabalho, uma vez que foram encontradas fêmeas naturalmente infectadas na mata. No domicílio e peridomicílio não foram encontradas fêmeas infectadas, porém não pode ser descartada a possibilidade das pessoas contrair leishmaniose nesses ambientes. Em todas as propriedades em que realizamos as coletas pelo menos duas pessoas já haviam contraído a parasitose.

Neste trabalho foram encontrados 2 *pools* de *Lu. (N.) intermedia* infectado com *Leishmania* sp. em 133 *pools* analisados e a taxa mínima de encontro foi de 0,2%. PAIVA *et al.*, (2010) encontraram flebotomíneos naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* no Mato Grosso do Sul por PCR. A taxa mínima de infecção foi de 1,6% para todas as espécies de flebotomíneos. ROCHA *et al.* (2010) encontrou DNA de *Leishmania* em 0,77% dos flebotomíneos, sendo predominante em *Lu. (N.) intermedia*. PITA PEREIRA *et al.* (2008) encontraram flebotomíneos infectados naturalmente com taxas de 1,5% para *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* e 0,7% para *Lu. (Nyssomyia) forattinii* nas amostras analisadas. PITA-PEREIRA *et al.* (2009) utilizando ensaio de PCR com *Lu. neivai*, encontraram resultados positivos para *L. (V.) braziliensis* em 3 dos 27 *pools* analisados, estimando uma taxa de infecção de 1,11%. MARCONDES *et al.* (2009) identificaram *Lu. neivai* naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* em 8 dos 61 *pools* analisados por PCR.

A PCR sem dúvida é uma ferramenta útil para detecção de *L. (V.) braziliensis*, por ser rápida e precisa para identificação de flebotomíneos infectados, otimizando o trabalho uma vez que pode ser realizado em *pools* com 10 ou mais flebotomíneos. Os trabalhos de dissecação que foram realizados no laboratório se mostraram trabalhosos

e demorados. Além disso, não foram encontradas formas promastigotas através desse método deixando evidente que práticas moleculares para investigar flebotomíneos naturalmente infectados são mais eficientes e rápidas. Além disso, flebotomíneos com baixa parasitemia dificilmente são detectados pela microscopia, fato que já não ocorre na PCR pela sensibilidade da técnica. Outra vantagem, é que foi possível analisar vários flebotomíneos ao mesmo tempo com *pools* de até 10 flebotomíneos, otimizando dessa forma o trabalho. Segundo MIRANDA *et al.* (2002) o encontro de *Lutzomyia sp.* com infecção natural de *Leishmania* em áreas endêmicas é muito baixa. Dessa forma, o encontro pelo método de dissecação torna-se ainda mais difícil.

Os resultados obtidos nesse estudo revestem-se de grande importância na epidemiologia da leishmaniose na região do Vale da Ribeira porque elucidam o papel de *Lu. (N.) intermedia* na transmissão de *Leishmania sp.*

## 7. CONCLUSÕES

- Os três métodos de extração de DNA mostraram-se eficientes, no entanto cuidados devem ser tomados ao utilizar a técnica do fenol/clorofórmio, pois o fato de ser demorado, e com várias etapas que podem levar até três dias, podem ocorrer erros durante o processo da extração, e também por apresentar substâncias que podem causar intoxicação e substâncias que são cancerígenas.

- O kit comercial se mostrou eficiente, porém seu custo é mais elevado que os outros dois métodos utilizados.

- O método escolhido na extração de DNA para a avaliação da infecção natural foi o Chelex, por ser uma técnica rápida, eficiente e de baixo custo.

- A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se mostrou eficiente em grupos de 1,3,6 e 10 flebotomíneos com 10, 50 e 100 promastigotas.

- A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se mostrou sensível na detecção de *L. (V.) braziliensis* em pools com 10 flebotomíneos.

- Foram analisadas 1014 fêmeas de *Lutzomyia (N.) intermedia* s.l., e dois pools (10 flebotomíneos/cada) em 133 pools analisados coletados na mata foram encontrados parasitados por *Leishmania* sp., apresentando taxa mínima de infecção de 0,2%.

- A espécie prevalente em Adrianópolis, região do Vale do Rio Ribeira, é a *Lutzomyia (N.) intermedia* com 99%. Sendo assim essa espécie pode ser considerada como vetor da Leishmaniose, em função da sua abundância, prevalência nos ecótopos e por ter sido encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* sp.

- Esta é a primeira ocorrência de fêmeas de *Lu. (N.) intermedia* infectada naturalmente por *Leishmania* sp. em Adrianópolis.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A Região do Vale do Ribeira por ser uma área endêmica da Leishmaniose Tegumentar Americana, estudos constantes devem ser realizados na tentativa de encontrar outras espécies de flebotomíneos infectados com *Leishmania* sp.

Neste trabalho foram realizadas coletas somente no município de Adrianópolis, no entanto coletas a fim de encontrar o protozoário, empregando técnicas moleculares, devem ser realizadas em outros municípios do Vale do Ribeira, como Cerro Azul e Doutor Ulysses, onde casos de leishmaniose vem sendo relatados.

Estudos futuros devem ser realizados na tentativa de encontrar reservatórios silvestres, uma vez que é provável que existam animais infectados na mata, local onde foram encontradas fêmeas infectadas por *Leishmania* sp.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.L. Mapa Paraná State. 2006, 1 fotografia, color. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Adrian%C3%B3polis\\_\(Paran%C3%A1\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Adrian%C3%B3polis_(Paran%C3%A1)). Acesso em 10/11/2011.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional de habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel E. F. & R. Lainson (Org.) Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p. 207-256. 367, 2003.

ANDRADE FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B. & A.L. FALCÃO. Polymorphism, inter-population and inter-specific variation in *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 50, p. 385-393, 2006.

ANDRADE FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B. & A.L. FALCÃO. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 98, p. 1059-1065, 2003.

AREZ, A.P.; LOPES, D.; PINTO, J.; FRANCO, A.S.; SNOUNOU, G.; ROSARIO, V.E. *Plasmodium* sp.: optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. **Experimental Parasitology**, v. 94, p. 269-72, 2000.

BACHA, H.A; TUONA, F.F; ZAMPIERI, R.A; FLOETER-WINTER, L.M; OLIVEIRA, J; NICODEMO, A.C; QUIROGA, M.M; MASCHERETTI, M;. BOULOS, M; AMATO, V.S. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n.105, p.173–178, 2011.



BANERJEE, S.K.; MAKDISI, W.F.; WESTON, A.P.; MITCHELL, S.M.; CAMPBELL, D.R. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. **BioTechniques**, v. 18, n. 5, p. 768-773, 1995.

CABRERA O.L.; MUNSTERMANN L.E.; CÁRDENAS R.; GUTIÉRREZ R. AND FERRO C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR em flebotominos. **Biomédica**, v. 22, p. 296-302, 2002.

CASTRO, E.A.; LUZ, E.; TELLES, F.Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I. THOMAZ-SOCCOL, V. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropical**, n. 93, p. 149, 2005.

COELHO, W.M.D ; RICHINI-PEREIRA,V.B; LANGONI, H; BRESCIANIA, K.D.S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, n.176, p.281–282, 2011.

DUNAISKI, M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.79, 2006.

DOUGALL, A.M; BRUCE A.; HOLT, D.C; HARRIS,T.; SULTAN, H.A; BATES, P.A; ROSE, K.; WALTON, S.F. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. **International Journal for Parasitology**, n. 41, p.571-579, 2011.

FERNANDES, J.V. MEISSNER, R.V.; M. FERNANDES, T. A. A.; ROCHA, L.R.M.; CABRAL, M.C.; VILLA, L.L. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p.141-146, 2004.

FERREIRA, A.L.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M. & FALQUETO, A. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Fiocruz, n. 96, p. 1061-1067, 2001

FORATTINI, O. P.; RABELLO, E.X.; SERRA, O.P.; COTRIM, M.D.; GALATI, E.A.B. & BARATA, J.M.S. Observações sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, n. 10, p. 31-43, 1976.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. EDUSP. São Paulo, v. 4, p. 658, 1973.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde), **Informe epidemiológico do SUS** , p. 86-87, 1999.

GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; SANTOS, J.F.L. & E.A. GALATI. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observation on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, n. 20, p. 280-287, 1986.

GONÇALVES, A.L. Aspectos epidemiológico e molecular de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) com ênfase ao complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), na região do Vale do Ribeira, área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, Estado do Paraná, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.98, 2010.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R.B & D. McH MAHON-PRATT. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, n.6, p. 687-725, 1989.

JONES T.C.; JOHNSON, J.R.W.D.; BARRETTO, A.C.; LAGO, E.; BADARÓ, R.; CERF, B.; REED, S.G.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANCA, T.F., WIESE, K; GOLLGHTLY, L.; FIKRIG. E.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 73-83, 1987.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H.; MIMORI, T; HASHIGUCHI, Y. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, n. 7, p. 814-826, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R.D. Ecology of Leishmania. **Parasitology**, n. 82, 1981.

LAINSON, R. & SHAW, J.J.. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, v. 1, p. 1–120,1987.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M. A newly revised classification. **Journal Parasitology**, n. 66, p. 830-834, 1980.

LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. Molecular markers in entomology (Review). **Bulletin of Entomological Research**, v. 88, p. 577–600. 1998.

MARCELINO, A.P; FERREIRA, E.C; AVENDANHA, J.S; COSTA, C.F; CHIARELLI, D; ALMEIDA, G.; MOREIRA, E.C; LEITE, R.C; DOS REIS, J.K.P; GONTIJO, C.M.F. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, n.183, p.54– 58, 2011.

MARCONDES C.B.; BITTENCOURT, I.A.; STOCO, P.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) spp* in Brazil. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, p. 1093–1097, 2009.

MARCONDES, C. B. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 91, p. 457-62, 1996.

MARCONDES, C.B. Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Tese de Doutorado**, Curitiba, Universidade Federal do Paraná. n. xxiv, p. 260, 1997.

MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, n. 44, p. 255–259, 2002.

MICHALSKY, E.M; GUEDES, K.S; SILVA, F.O.L; FRANÇA-SILVA, J.C; DIAS, C.L.F; BARATA, R.A; DIAS, E.S. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 44, p. 58-62, 2011.

MIRANDA, J.C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M.G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotominae with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 97, p. 185-188,

MS. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Editora MS, 2010, 180p.

PAIVA B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTTE, R.S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropical**, n. 115, p. 126–130, 2010.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE-JUNIOR, H.F.; MALAFRONTTE, R.S. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, n. 23, p. 87-94, 2007.

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; BLANCO, E. E. N. Interação vetor-hospedeiro: Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 275-289, 2003.

PITA-PEREIRA, D. M. A.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R. P. BRAZIL & C. BRITTO. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropical**, n. 107, p. 66–69, 2008.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G.D.; ZWETSCH, A.; ALVES, C.R.; BRITTO, C. & RANGEL, E.F. First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n.4, p. 593-595, 2009.

PITA-PEREIRA, D; SOUZA, G.D; PEREIRA, T.A; ZWETSCH, A; BRITTO, C; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Tropica**, n. 120, p. 273– 275, 2011.

PROGRAMA VALE DO RIBEIRA. Disponível em: <<http://www.valedoribeira.ufpr.br/vale.htm>>. Acesso em: 02/06/2010.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 937-954. 2009.

RANGEL, E.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

REY L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

ROCHA, L.S.; FALQUETO, A.; DOS SANTOS, C.B.; FERREIRA, A.L.; DA GRAÇA, G.C.; GRIMALDI, G. JR.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. **Philosophical Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, p.461–466, 2010.

RODAS, L.A.C. Colonização e infecção experimental de *Lutzomyia longipalpis*, para padronização da técnica de PCR e identificação de *Leishmania sp* no vetor. **Dissertação de Mestrado**, Secretaria da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças, Programa de Pós-Graduação em Ciências, São Paulo, p. 95, 2006.

RODRIGUES, E.H; FELINTO, D.E; BRITO, M.E; MENDONÇA, M.G.; WERKHÄUSER, R.P; COUTINHO, E.M; SOUZA, W.V. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

ROMERO, G.A.S.; GUERRA, M.V.; PAES, M.G.; CUPOLILLO, E.; TOALDO, C.B.; MACÊDO, V.O.; FERNANDES, O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropical**, n. 79, p. 225-229, 2001.

ROSSI, E.; BONGIORNO, G.; CIOLLI, E.; DI MUCCIO, T.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; MAROLI, M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropical**, n. 105, p. 158–165, 2008.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A. et al.,, Enzymatic amplification of b globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAVANI, E.S.; NUNES, V.L.; GALATI, E.A.; CASTILHO TM, ZAMPIERI, R.A.; FLOETER- WINTER, L.M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania spp.* in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, n. 160, p.18-24, 2009.

SILVA, A.C. & GOMES, A.C. Estudo da Competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, (Vianna, 1911). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 34, p. 187-191, 2001.

SIMONATO, L. E.; GARCIA, J.F; NUNES, C.M; MIYAHARA, G.I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 121-127, 2007.

STRAUSS-AYALI, D. C. L.; JAFFE, O.; BURSHTAIN, L.; GONEN, AND G. BANETH. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, n. 189, p. 1729-1733, 2004.

TEODORO, U.; KÜHL, J.B. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 512-6, 1997.

THOMAZ-SOCCOL, A.; MOCELLIN, M.; MULINARI, F.; CASTRO, E.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALCÂNTARA, F.S.; BAVARESCO, M.T.; HENNIG, L.; ANDRAUS A.; LUZ, E., THOMAZ-SOCCOL, V. Clinical Aspects and Relevance of Molecular Diagnosis in Late Mucocutaneous Leishmaniasis Patients in Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.54, n. 3, p. 487-494, 2011.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A.; CARVALHO, Y.; PEREIRA, E.A.; SZARGIKI, R.; ALCÂNTARA, F.; MACHADO, A.M.; WOŁODYMIR K.W.; LUZ, E. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of the State of Paraná, south of Brazil. **Acta Tropica**, n. 111, p. 308-31, 2009.



THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A.; LUZ, E.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; MEMBRIVE, N.; DEDET, J.P. *Leishmania* species in two regions of Paraná, Brazil: biochemical characterization by isoenzyme electrophoresis. **New Horizons in Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, p. 429–439, 2003.

VASCONCELOS, D.R.B; MELO, L.M; ALBUQUERQUE, E.S; LUCIANO M.C.S; BEVILAQUA, M.L. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology**, n.129, p.234–239, 2011.

VOLF AND MYSKOVA. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends in Parasitology**, n. 23, p. 91–92, 2007.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo : Editora Atheneu, p. 334, 1999.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 06/09/2011.

## 10. ANEXO 1

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania sp.* (CONTINUA)

<b>Espécie</b>	<b>POLL</b>	<b>Nº Flebotomíneos</b>	<b>Resultado</b>	<b>Coleta</b>	<b>Local</b>
<i>Lu. intermedia</i>	1	1	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	2	1	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	3	1	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P1	10	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P2	10	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P3	10	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P4	10	Negativo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P5	10	Positivo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P6	10	Positivo	Julho/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P7	10	Negativo	Julho/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P8	10	Negativo	Julho/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P9	5	Negativo	Julho/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P10	1	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P11	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P12	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P13	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P14	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P15	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P15	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P17	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania* sp. (CONTINUA)

<i>Lu. intermedia</i>	P18	6	Negativo	Julho/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P19	6	Negativo	Agosto/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P20	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P21	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P22	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P23	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P24	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P25	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P26	6	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P27	10	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P28	10	Negativo	Agosto/2010	Domicílio
<i>Lu. fischeri</i>	P29	3	Negativo	Agosto/2010	Casebre
<i>Lu. intermedia</i>	P30	10	Negativo	Agosto/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P31	10	Negativo	Setembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P32	10	Negativo	Setembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P33	10	Negativo	Setembro/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P34	6	Negativo	Setembro/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P35	5	Negativo	Setembro/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P36	4	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P37	2	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P38	1	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P39	10	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P40	10	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P41	10	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania* sp. (CONTINUA)

<i>Lu. intermedia</i>	P42	10	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P43	10	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P44	6	Negativo	Outubro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P45	10	Negativo	Novembro/2010	Bananal
<i>Lu. intermedia</i>	P46	10	Negativo	Novembro/2010	Bananal
<i>Lu. intermedia</i>	P47	10	Negativo	Novembro/2010	Bananal
<i>Lu. intermedia</i>	P48	10	Negativo	Dezembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P49	10	Negativo	Dezembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P50	10	Negativo	Dezembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P51	10	Negativo	Dezembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P52	5	Negativo	Dezembro/2010	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P53	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P54	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P55	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P56	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P57	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P58	6	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P59	6	Negativo	Dezembro/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P60	6	Negativo	Dezembro/2010	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P61	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P62	10	Negativo	Dezembro/2010	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P63	10	Negativo	Janeiro/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P64	10	Negativo	Janeiro/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P65	4	Negativo	Janeiro/2011	Mata

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania* sp. (CONTINUA)

<i>Lu. intermedia</i>	P66	10	Negativo	Janeiro/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P67	10	Negativo	Janeiro/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P68	10	Negativo	Janeiro/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P69	10	Negativo	Janeiro/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P70	10	Negativo	Fevereiro/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P71	10	Negativo	Fevereiro/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P72	10	Negativo	Fevereiro/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P73	10	Negativo	Fevereiro/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P74	8	Negativo	Fevereiro/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P75	10	Negativo	Fevereiro/2011	Bananeira
<i>Lu. intermedia</i>	P76	10	Negativo	Março/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P77	9	Negativo	Março/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P78	6	Negativo	Março/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P79	6	Negativo	Março/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P80	6	Negativo	Março/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P81	6	Negativo	Março/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P82	10	Negativo	Março/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P83	10	Negativo	Março/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P84	10	Negativo	Março/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P85	10	Negativo	Março/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P86	7	Negativo	Março/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P87	6	Negativo	Abril/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P88	6	Negativo	Abril/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P89	6	Negativo	Abril/2011	Domicilio

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania* sp. (CONTINUA)

<i>Lu. intermedia</i>	P90	6	Negativo	Abril/2011	Domicilio
<i>Lu. intermedia</i>	P91	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P92	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P93	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P94	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P95	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P96	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P97	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P98	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P99	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P100	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P101	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P102	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P103	6	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P104	5	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P105	7	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P106	6	Negativo	Abril/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P107	6	Negativo	Abril/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P108	5	Negativo	Abril/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P109	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P110	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P111	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P112	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P113	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio

RESULTADOS DE PCR COM EXTRAÇÕES REALIZADAS EM FÊMEAS, PARA ENCONTRO DE *Leishmania sp.*

<i>Lu. intermedia</i>	P114	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P115	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P116	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P117	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P118	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P119	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P120	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P121	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P122	6	Negativo	Abril/2011	Domicílio
<i>Lu. intermedia</i>	P123	10	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P124	10	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P125	10	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P126	10	Negativo	Abril/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P127	10	Negativo	Maio/2011	Bananeira
<i>Lu. intermedia</i>	P128	10	Negativo	Maio/2011	Bananeira
<i>Lu. intermedia</i>	P129	10	Negativo	Maio/2011	Bananeira
<i>Lu. intermedia</i>	P130	5	Negativo	Maio/2011	Mata
<i>Lu. intermedia</i>	P131	10	Negativo	Maio/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P132	10	Negativo	Maio/2011	Galinheiro
<i>Lu. intermedia</i>	P133	7	Negativo	Maio/2011	Galinheiro