

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Avaliação do teste rápido Sandfly para infecção natural por Leishmania em flebotomíneos”

por

Quezia Nunes Peres Dias

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza
Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela de Pita Pereira

Rio de Janeiro, maio de 2015.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

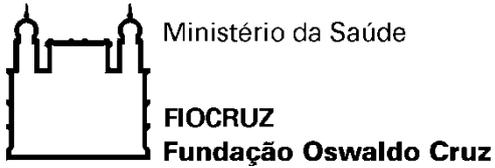
D541 Dias, Quezia Nunes Peres
Avaliação do teste rápido Sandfly para infecção natural
por Leishmania em flebotomíneos. / Quezia Nunes Peres
Dias. -- 2015.
xviii,112 f. :il. color. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Marcos Barbosa de Souza
Daniela de Pita Pereira

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

1. Leishmania - diagnóstico. 2. Psychodidae.
3. Leishmaniose Visceral - diagnóstico. 4. Leishmaniose
Cutânea - diagnóstico. 5. Avaliação. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9364



Esta dissertação, intitulada

“Avaliação do teste rápido Sandfly para infecção natural por Leishmania em flebotomíneos”

apresentada por

Quezia Nunes Peres Dias

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Luzia Monteiro de Castro Côrtes

Prof. Dr. Antonio Nascimento Duarte

Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza – Orientador principal

**Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas (DCB)
da ENSP - Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza e
Laboratório de Vetores do Campus da Fiocruz em Jacarepaguá,
além do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (IOC/Fiocruz),
com apoio da Marinha do Brasil e auxílio financeiro do Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Dedico este trabalho à três pessoas: minha mamãe Marina,
com quem dividi momentos difíceis durante este tempo
e que me apoiou e incentivou desde o primeiro instante em que
pensei em fazer o curso, e aos meus orientadores,
Dr. Marcos Barbosa de Souza e Dr.^a Daniela de Pita Pereira
que me guiaram nesta jornada de 2 intensos anos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional. Ao meu papai que sempre me apoiou nos estudos e hoje não pode estar aqui entre nós. À minha mamãe Marina, morena Marina! À minha irmã Raquel (minha irmã preferida no mundo todo!), meu irmão Samuel (meu irmãozinho do coração), meu cunhado e mais novo irmão Washington (melhor guitarrista do Brasil) e minha avozinha Maria que sempre apoiou a “trabalhar com bichos”.

Aos moradores da Ilha de Marambaia pelo acolhimento e gentileza em permitir a postura das armadilhas próximas às suas residências.

Aos meus orientadores, de que tenho muito orgulho: Dr. Marcos Barbosa de Souza, que sempre será o meu exemplo de pessoa e cientista (quando eu crescer quero ser igual a você), e Dr.^a Daniela de Pita Pereira, por ser a orientadora mais fofa e querida, pelos feriados gastos com correções, pelos ensinamentos, compreensão, apoio, paciência e amizade.

Agradeço a todos os queridos companheiros do Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza da ENSP, muitos dos quais me acompanham desde a Iniciação Científica e que muito me ensinaram (alguns estão hoje em outros laboratórios); em especial aos que me ajudaram no campo e aos que revisaram a identificação dos flebotomíneos para a realização deste trabalho: Adilson Almeida, Antônio de Medeiros Meira, Cesar do Santo Ponte (Cezinha), Ciro Benigno Villanova, Cleidil Nunes, Elir Dias, Flávio Alcelino, Jairo Caetano Meródio, Roberto Nei Martins Machado, Sidney da Silva Alves, Silvio Montenegro, Luiz Carlos Leite Pinna e Wallace Osório.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC, em especial à Taiana Amancio Rego e Dani Júnior pela colaboração na realização da PCR.

À Bio-Manguinhos pela produção dos kits de testes rápidos para este trabalho.

Ao Dr. Emilson Domingos da Silva, Dr.^a Janaina Pinho da Silva e Dr. Edmilson Domingos da Silva pelo auxílio em relação aos kits do teste rápido.

Ao Gabriel Amorim pela confecção dos desenhos para a montagem da figura do ciclo das leishmânias.

Às “leishcompanheiras”: Shênia Patrícia Corrêa Novo, Thaís Leal Souza, Monique Paiva de Campos, Denise Alves de Lima, Thais Araújo Pereira, Livia Aparecida Lopes do Carmo, por todo apoio oferecido durante o mestrado, sempre que precisei.

Ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo do IPEC e Dr.^a Fernanda Nunes Santos da ENSP pela disponibilidade em ajudar.

À Dr.^a Heloísa Helena Lopes dos Santos da Silva da ENSP por todo auxílio na esterilização e pelos cafés.

À Dr.^a Maria Alzira Pereira Montes pelo apoio, em especial no dia da entrevista do mestrado, em que foi extremamente gentil me tranquilizando.

Aos companheiros da ENSP pela fraterna convivência e apoio: Lidia Vidal da Silva de Carvalho, Rogéria Leite Peregrino Pinho, Rosa Maria Rodrigues Lopes, Fabiano Esteves Silva e Maria Isabel Pereira Soares.

Aos professores com os quais tive a honra de conviver e aprender, em especial a: Dr. André Reynaldo Santos Périssé (responsável por eu me apaixonar por epidemiologia), Dr. Luis David Castiel (ainda estou devendo uma conversa), Dr. Aduino José Gonçalves de Araújo, Dr. Antonio Nascimento Duarte, Dr. Valmir

Laurentino Silva, Dr.^a Tatiana Wargas de Faria Baptista, Dr.^a Elvira Maria Godinho de Seixas Maciel, Dr. Marcelo Firpo de Souza Porto, Dr.^a Sheila Maria Ferraz Mendonça de Souza, Dr.^a Enirtes Caetano Prates Melo e Dr.^a Rosely Magalhães de Oliveira.

Às minhas amigas de turma: Ana Paula Barbosa do Carmo, Clarissa Martins Christiano Melo, Marina Pinheiro de Castro, Natália Carvalho de Lima, Carolina Michelin, Raquel Barros de Almeida Araújo e Tais de Moura Ariza Alpino pelos ótimos e às vezes difíceis momentos que compartilhamos e dos quais não me esquecerei.

À minha amiga Juliana Tavares pela força no finalzinho do mestrado. Ufa!

Ao meu amigo Carlos Lima, meu companheiro botafoguense de todas as horas.

Aos companheiros do Centro de Cultura Social de Vila Isabel pela compreensão pelo meu afastamento.

À Fiocruz e à ENSP pela experiência única de estudar e fazer ciência nesta instituição.

À Marinha do Brasil pela estadia no Hotel de Oficiais em Marambaia durante o projeto e por todo o auxílio prestado para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos membros da banca.

À todos que contribuíram direta e indiretamente neste percurso.

À todas e todos, o meu muito obrigada!!!!

**“ É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.**

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

Resumo

Este trabalho buscou avaliar a eficiência do teste rápido SandFly em campo, tendo a PCR como padrão ouro. As coletas e a realização dos testes se deram na Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, que possui registros de LTA em humanos e LVC. As capturas de flebotomíneos ocorreram utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, que funcionaram entre 19:00 hr e 7:00 hr da manhã seguinte, durante 2 meses consecutivos, Setembro e Outubro de 2014, totalizando 8 coletas em 5 áreas distintas. No total, foram coletados 1505 espécimes de flebotomíneos. Para o diagnóstico de infecção, as fêmeas de cada coleta foram escolhidas ao acaso e separadas em *pools* de dez; cada *pool* foi macerado com o tampão de lise e metade de cada amostra foi utilizada nos testes; a outra metade foi encaminhada para realização da PCR. O restante dos flebotomíneos foi encaminhado para identificação de espécies. Nos TRs, 4 resultados foram positivos, 1 em Setembro (amostra A13) e 3 em Outubro (B11, B13 e B14) nos 49 *pools* analisados, todos sendo fracos. O diagnóstico pela PCR revelou infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos de 3 áreas na Ilha de Marambaia: Praia Grande, Praia de São José e Praia da Cutuca: 7 resultados positivos (A13, A17, A18, A19, A22, A23 e A24) nas 29 amostras de Setembro e 7 resultados positivos (B01, B02, B05, B06, B09, B13 e B17) nas 19 amostras com fêmeas de Outubro, totalizando 14 resultados positivos. Comparando ao padrão ouro, dos 49 testes realizados: 2 revelaram ser verdadeiros positivos, 33 verdadeiros negativos, 2 falsos positivos e 12 falsos negativos. Cálculos foram feitos para avaliar a eficiência do TR comparado à PCR: a sensibilidade relativa encontrada foi de 14% e a especificidade relativa de 94,2%. O Valor Preditivo Positivo encontrado foi VPP= 0,50 enquanto o Valor Preditivo Negativo foi VPN= 0,73; a acurácia foi 0,71. Para verificar a concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o índice de concordância de Kappa. Esta concordância foi considerada fraca, com o valor de $k=0,1091$. Concluiu-se que apesar do teste rápido SandFly possuir boa especificidade, a sensibilidade deve ser melhorada. Para identificar as espécies de flebotomíneos foi utilizada a nomenclatura de Galati (2003); dentre essas, 6 espécies foram identificadas *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. e *Micropygomyia capixaba*. Cabe ressaltar que as taxas de infecção encontradas foram altas e carecem de mais investigações. A taxa mínima de infecção referente aos dois meses foi de 2,9% e a taxa mínima de infecção em Praia Grande nos dois meses foi de 3,5%. A melhora da sensibilidade do teste rápido e sua validação de campo apontam para um avanço significativo na luta contra as Leishmanioses.

Palavras-chaves: teste rápido, flebotomíneos, leishmaniose.

Abstract

This study aimed to evaluate the efficiency of the Sandfly rapid test in the field considering the PCR as the gold standard. The collections and the tests were performed in Marambaia Island (State of Rio de Janeiro) that has records of Tegumentar Leishmaniasis in humans and Visceral Leishmaniasis in dogs. The collections were performed using CDC light traps from 7 pm to 7 am, for 2 consecutive months - September and October 2014, totaling 8 collections in 5 different areas. A total of 1505 sandflies were collected. Females of each collection were chosen at random and stored in labeled pools of 10 specimens. Each pool was macerated with lysis buffer solution and half of each sample was used in the tests; the other half of the samples was referred for evaluation of infection by *Leishmania* spp. through PCR. The remaining sandflies were sent for species identification. 4 rapid test results were positive - 1 September (sample A13) and 3 October (B11, B13 and B14) in the 49 analyzed pools and all were weak. Diagnosis by PCR revealed *Leishmania* natural infection in 3 areas in Marambaia Island: Praia Grande, Praia de São José and Praia da Cutuca. It was 7 positive results (A13, A17, A18, A19, A22, A23 and A24) in 29 samples of September and 7 positive results (B01, B02, B05, B06, B09, B13 and B17) in 19 samples with October females, totaling 14 positive results. Considering PCR as the gold standard, 2 rapid tests results were evaluated as true positives, 33 as true negative, 2 as false positives and 12 as false negatives. Some calculations were performed to evaluate the rapid test efficiency compared to PCR. The relative sensitivity was 14% and the relative specificity was 94.2%. The Positive Predictive Value was $PPV = 0.50$ while the Negative Predictive Value was 0.73. The accuracy was 0.71. The Kappa agreement index was used to verify the correlation between the diagnostic tests, that was considered weak, with the value of $k = 0.1091$. It was concluded that despite the Sandfly rapid test has a good specificity the sensitivity needs to be improved. 6 species of sandflies were identified: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. and *Micropygomyia capixaba*. It is noteworthy that infection rates found were high and require more investigation. The minimum infection rate of the two months was 2.9% and the minimum rate of infection in Praia Grande within two months was 3.5%. The improvement of the rapid test sensitivity and its field validation points to a significant advance in the fight against Leishmaniasis.

Key-words: rapid test, sandflies, leishmaniasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC: Center Disease Control (armadilha luminosa).

DCB: Departamento de Ciências Biológicas.

ENSP: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.

HIV: Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana).

hr: horas.

INI: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

IOC: Instituto Oswaldo Cruz.

kDNA - ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto .

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana.

LVA: Leishmaniose Visceral Americana.

LVC: Leishmaniose Visceral Canina.

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).

SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear.

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

sp: espécie.

spp: espécies.

SSC: Solução de citrato de sódio.

TR: Teste Rápido.

V: Volts.

(VPP): Valor Preditivo Positivo.

(VPN): Valor Preditivo Negativo.

LISTA DE SÍMBOLOS E MEDIDAS

(k): Kappa.

Km²: Quilômetros quadrados.

mL: mililitro.

pb: pares de bases.

°C: graus Celsius.

%: porcentagem.

μL: microlitro.

μm: micrômetro.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>.....	10
Gráfico 2. Número de Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral Notificados nos Anos de 2010 a 2013 por Unidade Federativa de Infecção.....	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fóssil de flebotomíneo em âmbar.....	4
Figura 2. Estágios do flebotomíneo.....	5
Figura 3. Foto de <i>Lutzomyia</i> sp. realizando repasto sanguíneo (medem cerca de 1 a 3 mm de comprimento).....	6
Figura 4. Amastigota (2 a 6 µm de diâmetro).....	8
Figura 5. Promastigota (15 a 30 µm de comprimento por 2 a 3 µm de diâmetro).....	8
Figura 6. Exemplo simplificado de ciclo de leishmânia.....	12
Figura 7. Paciente com LVA: estado inicial.....	19
Figura 8. Paciente com LVA: estado final.....	20
Figura 9. Lesão única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.....	22
Figura 10. Lesão na língua.....	22
Figura 11. LTA difusa - Lesão com áreas descamativas na orelha.....	22
Figura 12. Exemplo de resultado negativo.....	26
Figura 13. Exemplo de resultado positivo.....	26
Figura 14. Armadilha luminosa do tipo CDC no peridomicílio em Praia Grande.....	31
Figura 15. Paisagem da Vacaria.....	32
Figura 16. Local de coleta: Vacaria. Ponto 1.....	32
Figura 17. Local de coleta: Vacaria. Ponto 2.....	33
Figura 18. Paisagem do local de coleta: Praia Grande.....	33
Figura 19. Local de coleta: Praia Grande. Ponto 1.....	34
Figura 20. Local de coleta: Praia Grande. Ponto 2.....	34
Figura 21. Paisagem do local de coleta: Praia de Caetana.....	35
Figura 22. Local de coleta: Praia de Caetana. Ponto 1.....	35
Figura 23. Paisagem do local de coleta: Praia de São José.....	36
Figura 24. Local de coleta: Praia de São José. Ponto 1.....	36
Figura 25. Local de coleta: Praia da Cutuca. Ponto 1.....	37
Figura 26. Material utilizado em campo para realização dos testes rápidos.....	38
Figura 27. Testes Rápidos realizados em Setembro.....	44
Figura 28. Testes Rápidos realizados em Outubro (Continuação).....	45
Figura 29. Amostra A13 - Resultado positivo.....	46

Figura 30. Testes Rápidos realizados em Outubro.....	46
Figura 31. Testes Rápidos realizados em Outubro (Continuação).....	47
Figura 32. Amostra B11 - Resultado positivo.....	48
Figura 33. Amostra B13 - Resultado positivo.....	48
Figura 34. Amostra B14 - Resultado positivo.....	48
Figura 35. Gel demonstrativo dos resultados da PCR para avaliação de infecção natural de flebotómíneos por <i>Leishmania</i> spp. referente às amostras de Setembro.....	49
Figura 36. Gel demonstrativo dos resultados da PCR para avaliação de infecção natural de flebotómíneos por <i>Leishmania</i> spp. referente às amostras de Outubro.....	50

LISTA DE MAPAS

Mapa 1. Número de Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral Notificados nos Anos de 2010 a 2013 por Unidade Federativa de Infecção.....	14
Mapa 2. Número de Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral Notificados no Ano 2013 por Unidade Federativa de Infecção.....	15
Mapa 3. Local de coletas: Ilha de Marambaia.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Setembro: Amostras direcionadas à realização dos testes rápidos das respectivas coletas em diferentes áreas de Marambaia; dados de durante a realização dos testes.....	39
Tabela 2. Outubro: Amostras direcionadas à realização dos testes rápidos das respectivas coletas em diferentes áreas de Marambaia; dados de durante a realização dos testes.....	41
Tabela 3. Taxas mínimas de infecção encontradas nas áreas de coletas em Marambaia realizadas em Setembro e Outubro de 2014.....	50
Tabela 4. Comparação dos resultados da PCR com os dos Testes Rápidos.....	51
Tabela 5. Escala de concordância do Kappa.....	52
Tabela 6. Flebotomíneos não identificados.....	53
Tabela 7. Espécies capturadas em Setembro de 2014.....	54
Tabela 8. Espécies capturadas em Outubro de 2014.....	55
Tabela 9. Flebotomíneos identificados em Setembro.....	56
Tabela 10. Flebotomíneos identificados em Outubro.....	57
Tabela 11. Total de flebotomíneos identificados.....	58
Tabela 12. Espécies capturadas em Setembro e Outubro de 2014.....	59
Tabela 13. Espécies capturadas em Setembro e Outubro de 2014 – machos e fêmeas.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biologia Geral dos Flebotomíneos do Brasil.....	4
2.2. Vetor.....	6
2.3. O Parasito do Gênero <i>Leishmania</i>.....	7
2.4. Leishmanioses no Brasil.....	13
2.5. Leishmanioses no Rio de Janeiro.....	16
2.6. Social.....	17
2.7. Leishmaniose Visceral Americana (LVA)	19
2.8. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	21
2.9. Diagnóstico de Infecção Natural.....	23
2.10. Teste Rápido SandFly.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVO GERAL.....	28
4.1. Objetivos Específicos.....	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. Ilha de Marambaia, Município de Mangaratiba – RJ.....	29
5.2. Metodologia.....	31
6. RESULTADOS.....	44
6.1. Resultados dos Testes Rápidos.....	44
6.2. Resultados da PCR.....	49
6.3. Avaliação do Teste Rápido.....	50
6.4. Identificação das Espécies.....	53
7. DISCUSSÃO.....	61

8. CONCLUSÃO.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES.....	86

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são protozooses infecciosas e não contagiosas que podem manifestar-se nas Américas sob as formas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que acomete pele e mucosas - também conhecida como Leishmaniose Cutâneo-mucosa ou Muco-cutânea, e de Leishmaniose Visceral Americana (LVA), em que os parasitos migram para órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea. Se deixado sem tratamento, a LVA quase sempre resulta na morte e a LTA é capaz de causar lesões desfigurantes ¹ e mesmo levar ao óbito devido à ocorrência de infecções secundárias ².

São provocadas pelas leishmânias, protozoários parasitos tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, unicelulares com fases flageladas (promastigota) e sem flagelo aparente (amastigota). No Brasil, as espécies comuns são: *Leishmania (L.) infantum* (responsável pela LVA), *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (leishmânias responsáveis pela LTA) ³. No Rio de Janeiro, as espécies comuns são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (L.) infantum*.

Os principais vetores das Leishmanioses são os flebotomíneos, Dípteros da Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* (revisado por LAINSON & SHAW, 1987, 1992, 1998) ⁴, ⁵, ⁶ no Novo Mundo. As fêmeas, que são mais ativas durante o período noturno e apresentam hábitos hematófagos, transmitem os parasitos durante o repasto sanguíneo (Figura 3) ⁷.

Animais silvestres, domésticos e humanos atuam como hospedeiros.

As Leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica, estando presentes em 98 países e 3 territórios dos 5 continentes, em sua maioria, países mais pobres pertencentes à América, África, Europa e Ásia ⁸.

São doenças negligenciadas e emergentes – a LVA é considerada no Brasil uma “doença negligenciada de categoria 3, pois o campo da saúde pública não possui ferramentas efetivas para o controle avançado” - que atinge “principalmente populações de baixa renda, sendo considerada emergente devido à sua urbanização e à co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)” ⁹. Casos de co-infecção de leishmânia e HIV estão presentes em 35 países ¹⁰.

As Leishmanioses atingem pessoas de diferentes faixas etárias, sendo as crianças mais suscetíveis devido ao estado de relativa imaturidade imunológica celular, uma vez que a imunidade duradoura se desenvolve com a idade. A suscetibilidade é agravada

pela desnutrição, que é comum em algumas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio.

O diagnóstico humano é feito através de diversas técnicas, abrangendo métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, além do diagnóstico clínico.

Em 1909, a confirmação de formas de leishmânia em lesões cutâneas e mucocutâneas ocorreu no Brasil, quando Lindenberg encontrou parasitos em indivíduos que trabalhavam na construção de rodovias no interior de São Paulo, em áreas de desmatamento ¹¹.

O primeiro relato de LVA no Brasil aconteceu em 1934, quando foram encontradas formas amastigotas de leishmânia em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela ¹²; 20 anos passados, registrou-se o primeiro surto da doença, na cidade de Sobral, no Ceará. Na época, esta doença era detectada principalmente em ambientes rurais ¹³.

Entre 1985 e 2003 houve um aumento do número de casos de Leishmanioses e ampliação de sua ocorrência geográfica. A LTA é encontrada atualmente em todos os Estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos; já a LVA possui registro de notificação de infecção humana em 25 Unidades Federativas atualmente, segundo dados do Sinan, 2013 (Mapa 1).

O perfil das Leishmanioses no Brasil foi se modificando com o tempo. Havia primeiramente um perfil ocupacional, em que os trabalhadores oriundos de diversas partes do país se agregavam para desmatar determinadas áreas e erguer construções como rodovias e usinas; ao penetrar na mata e desmatar, causavam um desequilíbrio ecológico e interferiam diretamente no ciclo original do parasito na área, culminando em surto de infecção. Em seguida o perfil passou a ser domiciliar rural, em que os moradores próximos à mata e mais expostos no peridomicílio, como as crianças, se infectavam com maior frequência. Recentemente no Brasil, as Leishmanioses atingem não apenas áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas, como também áreas urbanas de alguns estados, como Belo Horizonte, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro ¹⁴.

As medidas existentes para o controle destas protozooses são: o tratamento médico humano, que utiliza principalmente como medicamentos os antimoniais pentavalentes, a vacinação canina (LVA), o uso de repelentes em caninos e humanos, a telagem das casas e uso de mosquiteiros, campanhas educativas e aspersões de inseticidas de ação residual (LVA). Este último é apenas direcionado para a forma adulta do vetor, pois ainda são insuficientes os dados relacionados aos potenciais criadouros naturais de flebotomíneos

no Novo Mundo. O extermínio de cães sintomáticos é ineficiente enquanto medida e seu tratamento ainda é controverso.

Devido à sua ampla distribuição mundial e às suas graves manifestações, a Organização Mundial de Saúde incluiu as Leishmanioses entre as seis mais importantes endemias do mundo ^{15, 16}.

É necessário que haja vigilância e monitoramento nas unidades territoriais definidas como áreas de produção das Leishmanioses, assim como de suas características ambientais, sociais e econômicas, voltando as ações para o diagnóstico precoce, tratamento adequado dos casos detectados e estratégias adequadas de prevenção e controle ¹¹.

Apesar das medidas de controle tomadas, as Leishmanioses seguem atualmente em ampla expansão geográfica (Mapa 1), sendo necessário o conhecimento sobre a infecção da fauna flebotomínica pelo agente etiológico das Leishmanioses para o monitoramento das áreas potencialmente produtoras destas doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia Geral dos Flebotomíneos do Brasil

Classificação Taxonômica dos Flebotomíneos:

Reino: **Animalia** Linnaeus, 1758

Filo: **Arthropoda** Latreille, 1829

Classe: **Insecta** Linnaeus, 1758

Ordem: **Diptera** Linnaeus, 1758

Subordem: **Nematocera** Scopoli, 1786

Família: **Psychodidae** Newman, 1834

Subfamília: **Phlebotominae** Rondani, 1840

Os flebotomíneos são conhecidos no Brasil como cangalha, cangalhinha, mosquito-palha, birigui, tatuira, dentre outros nomes, e são vetores das Leishmanioses (Figura 1).

As Leishmanioses são doenças que já existiam desde tempos pré-históricos e que existem ainda hoje em grande parte do mundo. Os primeiros registros da subfamília *Phlebotominae* datam do Cretáceo Inferior¹⁷.



Figura 1. Fóssil de flebotomíneo em âmbar.

Fonte: <http://www.fossilmuseum.net/EdResources/Amber-Images.htm>

Não existem estudos no Novo Mundo que comprovem de forma eficaz criadouros naturais de flebotomíneos. Segundo estudos realizados em laboratório com criações de flebotomíneos, estes insetos não realizam postura em ambiente aquático; seus ovos são colocados em ambientes sombreados e ricos em matéria orgânica e suas formas imaturas se desenvolvem em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, tendo resíduos orgânicos por substrato, principalmente de natureza vegetal. Ocorrem quatro estágios larvais, havendo pouquíssima diferença de tamanho entre elas; as larvas de flebotomíneos não resistem à dessecação nem a variados períodos de umidade ⁷.

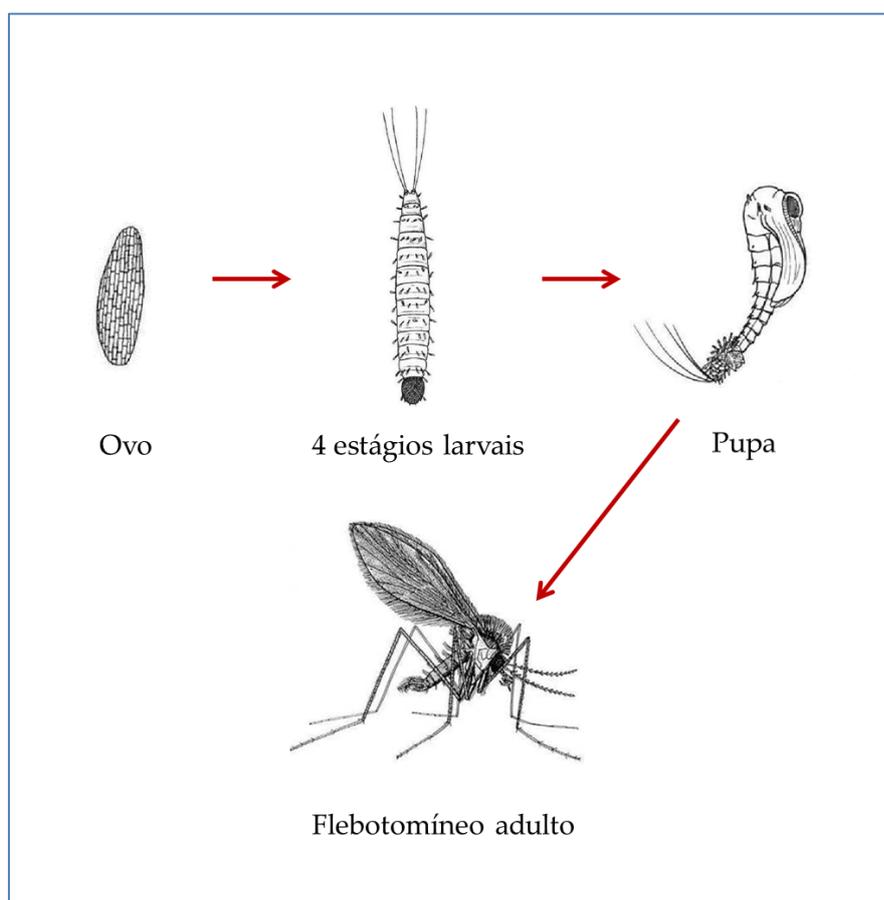


Figura 2. Estágios do flebotomíneo.

Após a saída da pupa, o flebotomíneo mede de 1 a 3 mm (Figura 2). Fêmeas e machos alimentam-se de sucos vegetais mais ou menos ricos em substâncias açucaradas. As fêmeas são hematófagas. Possuem hábito crepuscular ou noturno, embora atualmente algumas espécies sejam encontradas mesmo durante o dia. Há diversos fatores que influenciam a saída de seus abrigos, sendo de maior importância as condições climáticas do ambiente ⁷.

A subfamília Phlebotominae inclui seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo ¹⁸.

2.2. Vetor

Mais de vinte espécies de leishmânias são agentes causadores das Leishmanioses ¹⁹ e cerca de 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados ou suspeitos na transmissão de leishmânias no mundo, apesar de existirem aproximadamente 1000 espécies já descritas ¹⁵. Nas Américas são conhecidas mais de 400 espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (revisado por LAINSON & SHAW, 1987 ⁴, 1992 ⁵, 1998 ⁶) ¹⁸.



Figura 3. Foto de *Lutzomyia* sp. realizando repasto sanguíneo (medem cerca de 1 a 3 mm de comprimento).

Fonte: www.fiocruz.br/ccs/especiais/paleo/leishmaniose_fer.jpg

No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Nyssomyia intermedia*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia umbratilis* e *Psychodopygus wellcomei* ¹¹.

Quanto à LVA, existem no Brasil duas espécies relacionadas à sua transmissão: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*; *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie vetora da *L. (L.) infantum* no Brasil e, mais recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul ^{20, 21}. No Brasil, a distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão ¹⁴.

2.3. O Parasito do Gênero *Leishmania*

Classificação Taxonômica das Leishmânias:

Reino: **Protista** Haeckel, 1886

Subreino: **Protozoa** Goldfuss, 1817

Filo: **Sarcomastigophora** Honiberg & Balamuth, 1963

Subfilo: **Mastigophora** Diesing, 1866

Classe: **Zoomastigophorea** Calkins, 1909

Ordem: **Kinetoplastida** VickKerman, 1976

Subordem: **Trypanosomatina** Kent, 1880

Família: **Trypanosomatidae** Doflein, 1901

Gênero: ***Leishmania*** Ross, 1903

Subgêneros: ***Leishmania*** Ross, 1903 e ***Viannia*** Lainson & Shaw, 1987

Os agentes etiológicos das Leishmanioses são os protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*²² que pertencem ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, todos com graus variáveis de especificidade pelo hospedeiro invertebrado²³. São organismos unicelulares contendo uma organela especializada denominada cinetoplasto e possuem ciclo digenético, ou seja, que requer a participação de mais de um hospedeiro para completar o ciclo biológico (um vertebrado - como, por exemplo, roedores, marsupiais, canídeos e primatas – e outro invertebrado – o flebotomíneo). Humanos podem ser considerados hospedeiros acidentais, sendo dispensáveis no ciclo do parasito²⁴.

Estes protozoários apresentam duas formas morfológicas distintas durante seu ciclo: amastigota e promastigota (Figuras 4 e 5). As leishmânias são encontradas no tubo digestivo dos flebotomíneos (fêmeas) em sua forma promastigota (flagelada) e são parasitas intracelulares obrigatórios das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos vertebrados na sua forma amastigota (forma oval ou esférica, sem flagelo aparente).

Nos hospedeiros vertebrados destes protozoários, pertencentes a várias ordens e espécies, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do SFM e na medida em que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem, liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos.

Ao realizarem o repasto sanguíneo a partir de indivíduos portadores de alguma espécie de leishmânia, os flebotomíneos ingerem células do sangue contendo parasitos.

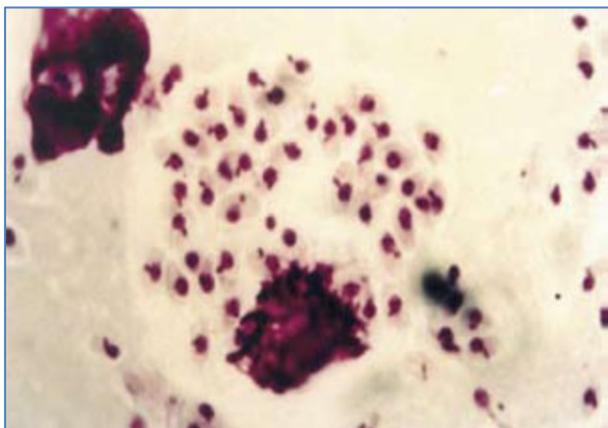


Figura 4. Amastigota (medem cerca de 2 a 6 μm de diâmetro).

Fonte: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/lt/definicoes/>



Figura 5. Promastigota (medem cerca de 15 a 30 μm de comprimento por 2 a 3 μm de diâmetro).

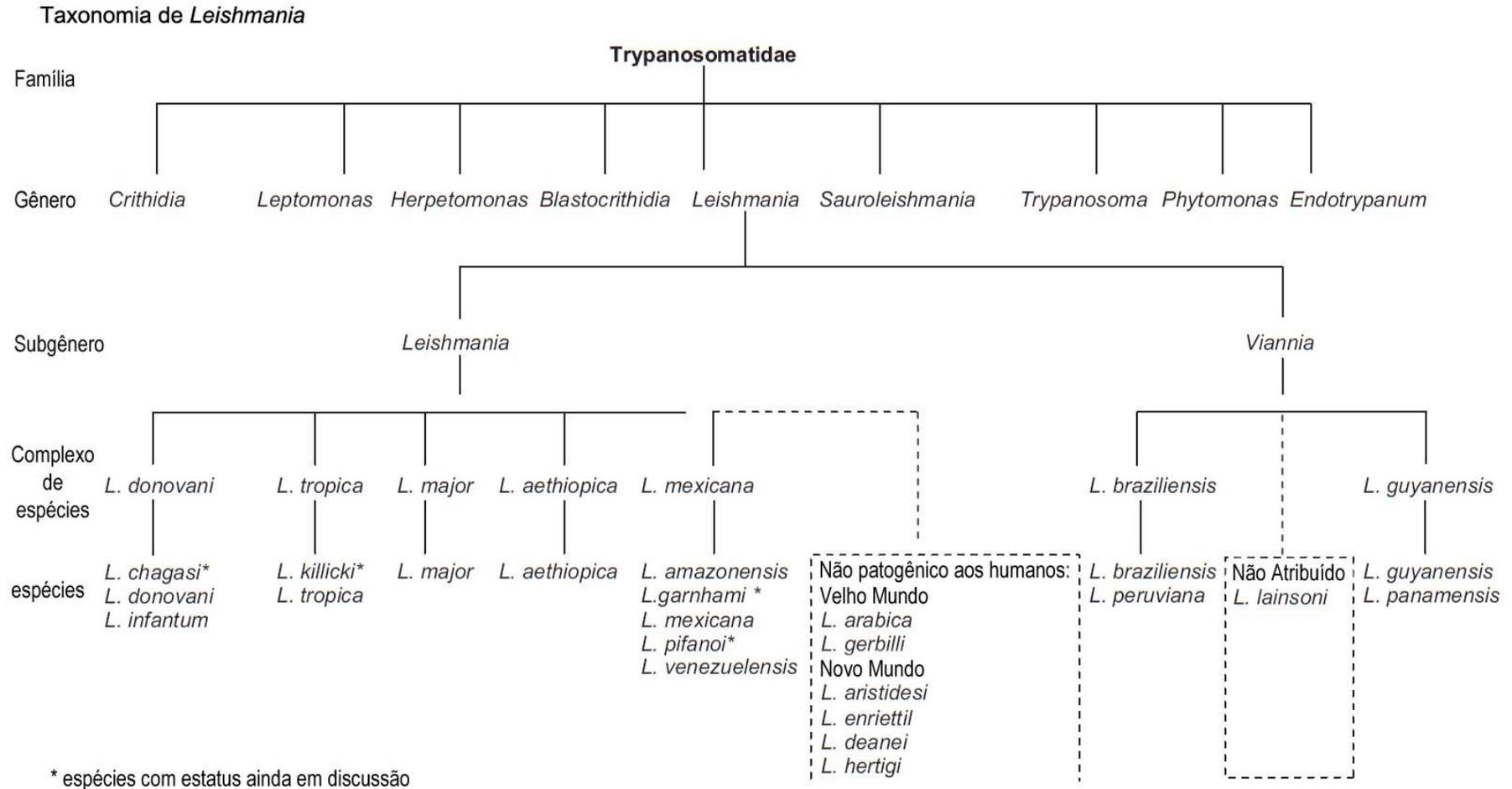
Fonte: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/lt/definicoes/>

Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies de leishmânia que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: o subgênero *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*^{4,25} (Gráfico 1). De acordo com esta classificação, as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se de forma exclusiva na porção média e anterior do intestino (seção Suprapilaria), enquanto as espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se nas partes anterior e média, assim como no intestino posterior na região do piloro (seção Peripilaria) dos flebotomíneos²⁶. Esta classificação se mantém e é

corroborada pela análise de caracteres intrínsecos como isoenzimas ²⁷, análise da seqüência do gene de mini-exon ²⁸, análise dos perfis de restrição (RFLP) dos espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor (SSU rRNA) ^{29, 30}, e mais recentemente, através da análise de curvas de dissociação térmica por PCR em tempo real, utilizando como alvo a região conservada dos minicírculos de kDNA ³¹. Os parasitos de répteis foram agrupados em um novo gênero: *Sauroleishmania* ^{32, 33}.

Estudos baseados em aspectos bioquímicos e moleculares apontam claras relações filogenéticas entre tripanosomatídeos do gênero *Endotrypanum*, que parasitam hemácias de preguiças (Bradypodidae ou Megalonychidae) na forma tripomastigota ou epimastigota, mas desenvolvem-se nos flebotomíneos e em culturas *in vitro* como promastigotas, e algumas espécies de *Leishmanias* que tinham classificação incerta, sugerindo a criação de duas linhagens genéticas distintas, as “Seções” *Euleishmania* e *Paraleishmania*. A primeira compreende os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*; a segunda abriga o gênero *Endotrypanum* e *L. herreri*, *L. deanei*, *L. hertigi*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis* ^{30, 34, 35}.

Gráfico 1. Taxonomia do gênero *Leishmania* (WHO, 2010) ²⁵.



Ciclo de Vida das Leishmânias:

1) As fêmeas de flebotomíneos ingerem sangue ou linfa intersticial com macrófagos com as formas amastigotas ao realizarem repasto sanguíneo em animais vertebrados hospedeiros de leishmânias infectados.

2) No tubo digestivo destes insetos, os macrófagos são lisados, permitindo assim o acesso dos parasitos ao ambiente extracelular; envolvidas pela membrana peritrófica produzida pelo tecido epitelial do intestino médio do flebotomíneo, as amastigotas dividem-se ao menos uma vez antes de transformarem-se em promastigotas;

3) As formas reprodutivas não infectantes prendem-se à parede do tubo digestivo após atravessarem a matriz peritrófica (tanto o não escape da matriz quanto a não adesão à parede do epitélio fazem com que os parasitos sejam eliminados ao fim da digestão do sangue), onde sofrem o ataque das enzimas digestivas. É então desencadeada uma metaciclologênese, processo no qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes, ocorrendo a transformação nas formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas). Durante a metaciclologênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície e perdem sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio dos flebotomíneos. Estas formas promastigotas metacíclicas, então, migram para a faringe e cavidade bucal - são encontradas livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal (proventrículo e faringe) do inseto - de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo.

4) As formas promastigotas metacíclicas se concentram na região da válvula estomodeal (cárdia) promovendo sua destruição, que acontece devido à degradação de uma camada de quitina que reveste esta porção do intestino do inseto através da liberação de quitinase, produzida pelo próprio parasito ³⁶. A destruição da válvula faz com que o flebotomíneo regurgite no local da picada, ao realizar o repasto sanguíneo no animal vertebrado, o conteúdo intestinal da porção anterior do tubo digestivo (cárdia e probóscide) com as promastigotas metacíclicas, podendo infectar o hospedeiro vertebrado. Estas formas flageladas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos e eosinófilos e depois por macrófagos e células dendríticas ^{37, 38}.

5) Dentro dos vacúolos dos macrófagos, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária.

6) O núcleo do macrófago chega a deslocar-se do centro para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas, esgotando-se sua resistência e levando ao seu

rompimento; as amastigotas liberadas devido ao rompimento dos macrófagos são fagocitadas por outros macrófagos.

O ciclo continua quando flebotomíneos realizam repasto sanguíneo em animais vertebrados portadores de leishmânias e são infectados, transmitindo-as a novos hospedeiros vertebrados (Figura 6).

Observação: Quanto à LVA, os parasitos multiplicam-se nos macrófagos da pele, alcançando depois as células SFM dos órgãos internos, principalmente baço, fígado e medula óssea. Quanto à forma da LTA difusa, as leishmânias são disseminadas pelas vias linfática ou hematogênica, causando múltiplas lesões nodulares não ulceradas.

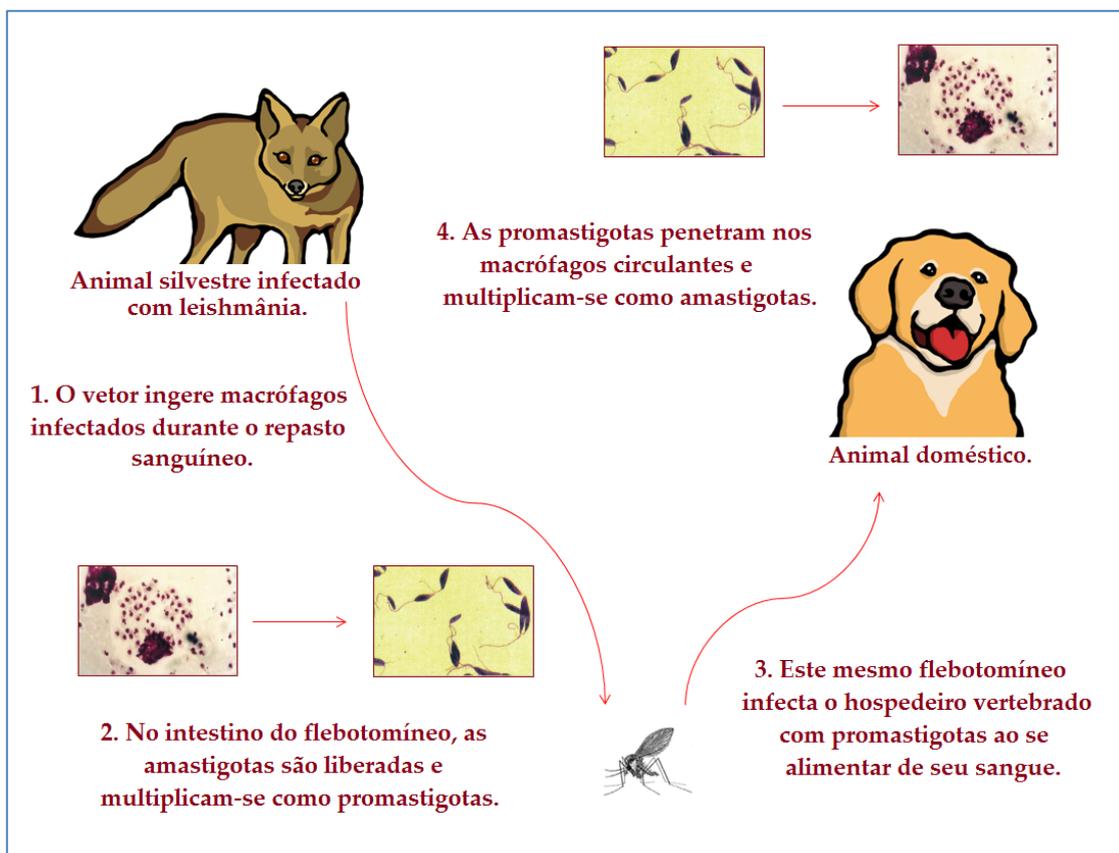


Figura 6. Exemplo simplificado de ciclo de leishmânia.

Adaptado com imagens de: Ministério da Saúde, 2013¹⁴; Andrade et al, 2006³⁹; Gabriel Amorin.

2.4. Leishmanioses no Brasil

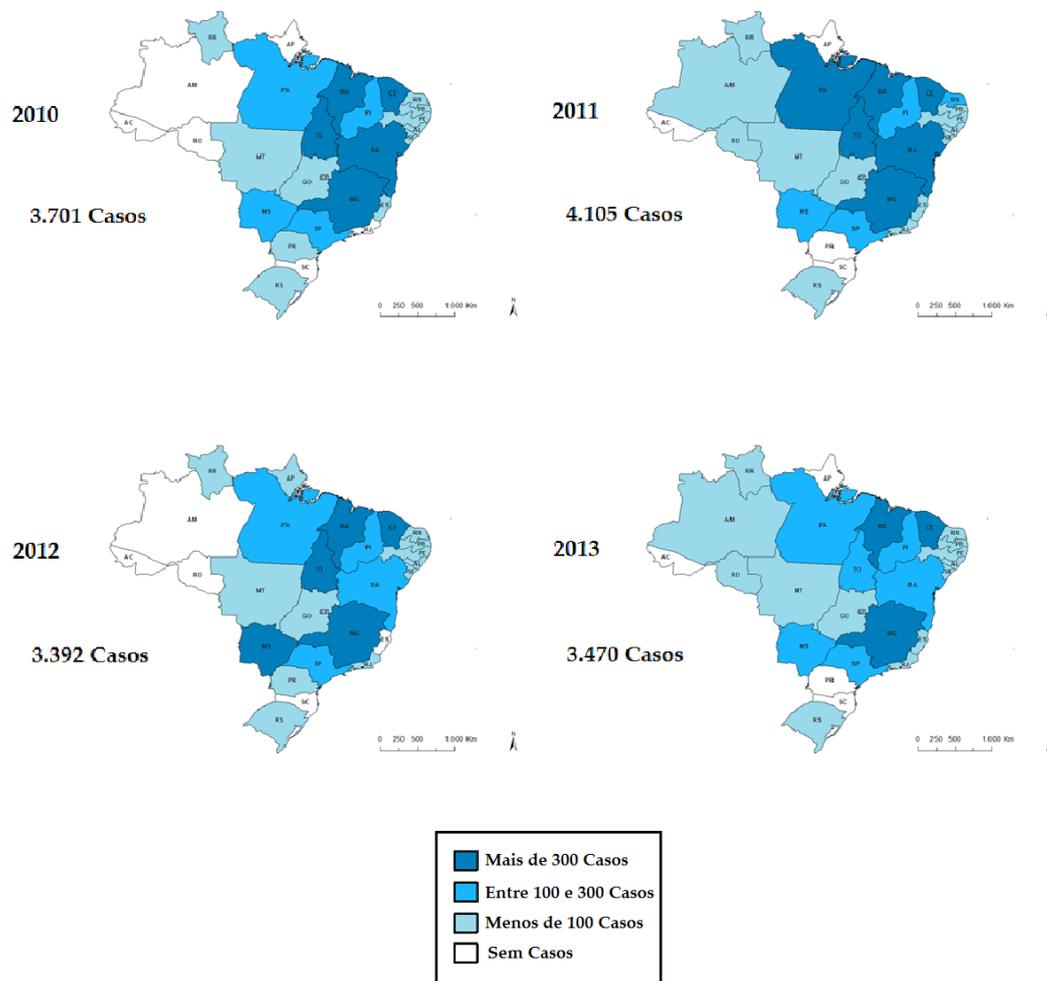
A descoberta dos agentes etiológicos das Leishmanioses se deu no final do século XIX na Índia, quando Cunningham, em 1885 descreveu formas amastigotas em casos de Calazar. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. Posteriormente, diferentes relatos demonstraram que o Calazar não ocorria somente na Índia.

No continente americano, especificamente no Brasil, a confirmação de formas de leishmânias em lesões cutâneas e muco-cutâneas ocorreu em 1909, quando Lindenberg encontrou parasitos em indivíduos que trabalhavam na construção de rodovias, em áreas de desmatamentos, no interior de São Paulo. A correlação de várias doenças que criavam lesões (LTA) com um protozoário do gênero *Leishmania* foi estabelecida por Gaspar Vianna, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, que lhe deu o nome de *Leishmania braziliensis*. Em 1922, Aragão ⁴⁰ demonstrou pela primeira vez o papel do flebotomíneo na transmissão da LTA. Forattini (1958) ⁴¹ encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo ⁴².

No Brasil, o primeiro registro de caso de LVA ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso ⁴³. Os primeiros relatos desta doença foram feitos por Penna em 1934, Chagas em 1936 e Cunha e Chagas em 1937, onde num estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, foram encontrados 41 casos positivos para leishmânia em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste ¹² - na época tal doença era detectada principalmente em ambientes rurais.

Na década de 1980, houve uma expansão para áreas urbanas. A partir da década de 90, foi detectada a presença de casos autóctones em 19 dos 27 estados brasileiros, demonstrando sua ampla expansão, incluindo a notificação de casos em regiões litorâneas, próximas a centros urbanos, e mesmo a sua disseminação em áreas urbanas de grandes cidades brasileiras, como nos estados do Pará e Tocantins na Região Norte, Mato Grosso do Sul na Região Centro-oeste e Minas gerais e São Paulo na Região Sudeste. Em 2003, já haviam sido confirmados casos autóctones de LTA em todos os estados brasileiros e atualmente a LVA possui registro de infecção humana em 25 Unidades Federativas (Mapas 1 e 2; Gráfico 2) ⁴⁴.

Número de Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral Notificados nos Anos de 2010 a 2013 por Unidade Federativa de Infecção.



Mapa 1. Mapas elaborados a partir de dados do Sinan, 2013.

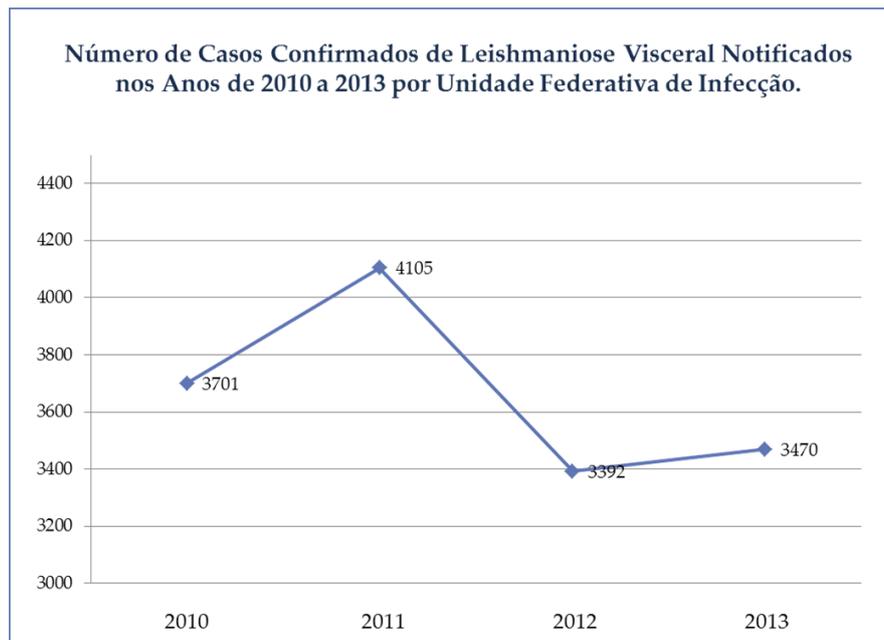
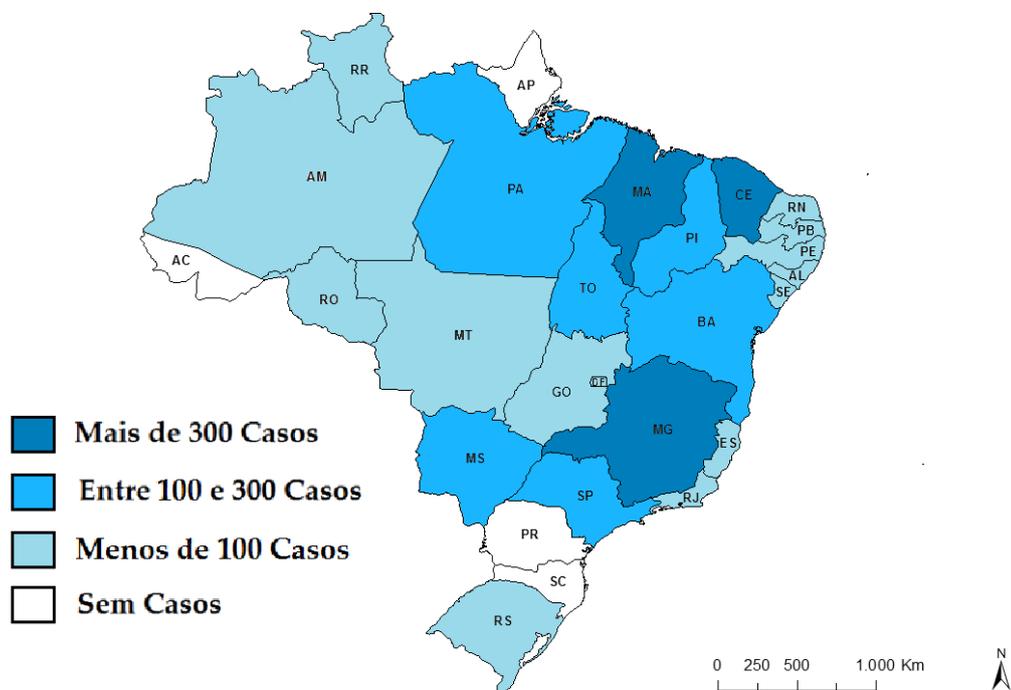


Gráfico 2. Gráfico elaborado a partir de dados do Sinan, 2013.

Número de Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral Notificados em 2013 por Unidade Federativa de Infecção.



Mapa 2. Mapa elaborado a partir de dados do Sinan, 2013.

A Leishmaniose com manifestação com lesões cutâneas é mais amplamente distribuída pelo mundo, sendo cerca de 90% dos casos humanos são encontrados nas Américas, Bacia do Mediterrâneo e na região da Ásia ocidental do Oriente Médio até a Ásia Central; a maioria dos casos encontra-se em seis países – Brasil, Algéria, Afeganistão, Paquistão, Colômbia, Irã, Síria, Arábia Saudita e Peru. Quase 90% dos casos de Leishmaniose com manifestação com lesões muco-cutâneas ocorrem em três países da América do Sul – Brasil, Bolívia e Peru. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral são registrados em seis países – Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão ⁴⁵.

O tratamento médico humano utiliza principalmente medicamentos antiparasitários e uma droga antineoplásica, entre elas, os antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina (Glucantime®), as Pentamidinas (Pentam-300®), a anfotericina B (AmBisome®) e a miltefosina, de uso, eficácia e dosagens distintas ^{46 47}. Todas as drogas utilizadas possuem toxicidade considerável.

A associação das Leishmanioses em pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumenta a dificuldade do controle, uma vez que a resposta imune celular requerida para o combate à infecção por leishmânia é justamente aquela eliminada pela co-infecção ⁴⁸.

Para que as Leishmanioses ocorram em uma determinada área é preciso a presença de: 1) agente etiológico, 2) de vetor suscetível e 3) de hospedeiro suscetível. O fato de alguns hospedeiros silvestres possuírem hábitos sinantrópicos, a ocorrência de desflorestamentos e a existência de espécies de flebotomíneos pré-adaptadas a um ambiente mais urbano contribuem para a expansão de tais doenças.

2.5. Leishmanioses no Rio De Janeiro

Os primeiros estudos relacionados aos flebotomíneos no Rio de Janeiro se devem a Aragão (1922 ⁴⁰; 1927 ⁴⁹), que relacionou *Nyssomyia intermedia* à transmissão da LTA. Mais tarde, outros estudos assinalaram um predomínio de *N. intermedia*, seguido de *M. migonei* na cidade do Rio de Janeiro ⁵⁰, assim como destas e de outras espécies no interior do Estado ^{51, 52, 53, 54, 55, 56}.

No Estado do Rio de Janeiro, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) foi registrada pela primeira vez em 1978 no município do Rio de Janeiro. Foram notificados em 1983, 35 casos autóctones de LVA nas vertentes continentais norte, noroeste, oeste e sudeste do Maciço da Pedra Branca ⁵⁷.

Quanto à LTA, casos autóctones esporádicos já eram diagnosticados na cidade do Rio de Janeiro desde o início do século XX. A primeira epidemia foi registrada em 1922, em Águas Férreas, no maciço da Tijuca, região central da cidade. Mais tarde, na década de 50, houve um surto no município de Magé, interior do Estado do Rio de Janeiro; tal surto foi controlado devido às aspersões de inseticidas (DDT) voltadas para o controle da malária, na época. Na década de 70, provavelmente graças à interrupção das dedetizações devido à suspensão do programa de combate à malária, houve um recrudescimento da LTA na maioria das regiões brasileiras ⁵⁸; em 1973, uma nova epidemia passou a atingir localidades situadas em outra área da cidade – na Zona Oeste, nas encostas e várzeas do maciço da Pedra Branca, de onde já se sabia da predominância de *N. intermedia* e onde ainda existia importante cobertura florestal, com matas de formação secundária e atividades agrícolas residuais ⁵⁹,

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é endêmica no Estado do Rio de Janeiro desde o início do século passado, e é atualmente endêmica em vários municípios do Rio de Janeiro.

O principal vetor da LVA no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, foi apontado por evidências epidemiológicas como vetor desta protozoose no município do Rio de Janeiro ⁶⁰.

A espécie vetora *Nyssomyia intermedia*, pré-adaptada ao ambiente alterado ⁶¹, passou a ser considerada vetora potencial da LTA ^{62, 63} acompanhada, mais recentemente no município do Rio de Janeiro, pela *Lutzomyia migonei*. Ambas têm sido encontradas em domicílios e em seus anexos (peridomicílio).

Deve-se ressaltar o fato de o desflorestamento ter influência sobre a posição de *N. intermedia* na composição da fauna flebotomínica de diversas áreas, uma vez que, quando o ambiente florestal permanece inalterado esta espécie é capturada quase que acidentalmente, evoluindo à condição de dominância quase absoluta com a ocorrência de devastação florestal, entretanto ^{7, 64, 65, 66, 67, 68}.

No Rio de Janeiro, as espécies de leishmânias comuns são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (L.) infantum*.

2.6. Social

Pesquisas mostraram nos anos passados que a LTA estava associada principalmente aos trabalhadores do sexo masculino, envolvidos com atividades agrícolas e extrativistas ⁶⁹. Entretanto, com o passar do tempo e com a sua crescente

distribuição geográfica, foi sendo registrado um aumento considerável no número de casos de mulheres e diferentes faixas etárias ⁷⁰, denotando a possibilidade de transmissão peridomiciliar e intradomiciliar. Anteriormente os casos humanos eram comuns quando se penetrava o foco zoonótico, mas com o passar do tempo passou a haver outros perfis epidemiológicos, principalmente devido à pré-adaptação de algumas espécies de flebotomíneos a áreas antropologicamente modificadas.

Atualmente, as Leishmanioses são encontradas em áreas rurais, áreas desflorestadas (mais recentemente associadas às ocupações desordenadas), como também em centros urbanos.

Pouco se divulga a respeito das Leishmanioses fora da comunidade científica. Sendo assim, a população de uma nova área endêmica, graças à crescente expansão geográfica de seus vetores, geralmente não tem conhecimento sequer da existência de tais doenças.

As Leishmanioses atingem pessoas de diferentes faixas etárias, sendo as crianças mais suscetíveis devido ao estado de relativa imaturidade imunológica celular, uma vez que a imunidade duradoura se desenvolve com a idade. Tal suscetibilidade é agravada por uma maior exposição ao vetor no peridomicílio, além da desnutrição, que é comum em áreas endêmicas.

Um dos fatos críticos relacionados às complicações clínicas das Leishmanioses é que integrantes de populações mais carentes tendem a tratar as manifestações clínicas iniciais de doenças de forma autônoma e a buscar pelo diagnóstico e tratamento médico quando a doença já se encontra em estágio avançado ⁴⁸.

Os medicamentos disponíveis ao tratamento médico humano têm alto custo e efeitos colaterais significativos devido à toxicidade.

O desflorestamento - mais recentemente relacionado às ocupações irregulares - tem influência sobre a presença de espécies de flebotomíneos de importância epidemiológica pré-adaptados ao ambiente alterado; assim, quando o ambiente florestal permanece inalterado esta espécie é capturada quase que acidentalmente, evoluindo à condição de dominância quase absoluta com a ocorrência de devastação florestal.

Faz-se necessário haver vigilância e monitoramento nas unidades territoriais definidas como áreas de produção desta doença, assim como de suas características ambientais, sociais e econômicas, voltando as ações para o diagnóstico precoce, tratamento adequado dos casos detectados e estratégias adequadas de prevenção e controle ⁴².

2.7. Leishmaniose Visceral Americana (LVA)

Conhecida também como Calazar, esta é a mais grave das Leishmanioses, podendo ser fatal se não tratada. Pode haver pacientes assintomáticos, oligossintomáticos (manifestações clínicas discretas) que evoluem para cura espontânea, e oligossintomáticos que evoluem para a forma clássica da doença. Sua manifestação clínica está associada à desnutrição - nos pacientes desnutridos, a forma clássica da doença da LVA é frequente¹⁴. O período de incubação é bastante variável; em humanos o período é de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses e em cães é de 3 meses a vários anos, com média de 2 a 7 meses⁷¹.

. Nos casos clínicos, os principais sintomas apresentados são: febre prolongada e intermitente, com períodos de remissão de semanas, podendo apresentar picos diários; emagrecimento; hepatomegalia; esplenomegalia (Figuras 7 e 8); anemia severa (a anemia se agrava de acordo com a progressão da doença, tendendo a ocorrência de hemorragias), leucopenia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso devido à perda de apetite e caquexia. Também pode ocorrer um complexo de manifestações imunomediadas, como uveíte e nefrite.

O diagnóstico clínico da LVA em humanos é complexo devido aos sinais e sintomas apresentados serem comuns a outras patologias, como Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose.

As alterações laboratoriais são sugestivas, porém não patognomônicas e quase sempre presentes nos casos de longa duração. Ocorre pancitopenia (inibição da medula óssea), hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia e alterações bioquímicas hepáticas de discretas a moderadas.



Figura 7. Paciente com LVA: estado inicial.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 1ª edição (2006).



Figura 8. Paciente com LVA: estado final.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 1ª edição (2006).

No Novo Mundo, a *Leishmania (L.) infantum* é o agente etiológico da LVA. São duas as espécies de flebotomíneos vetores conhecidos da LVA no Brasil: *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia longipalpis*, sendo esta última mais amplamente dispersa pelo país. Entretanto, em algumas áreas endêmicas de LVA não são encontradas nenhuma destas duas espécies.

Os principais hospedeiros silvestres da *L. (L.) infantum* (syn. *L. chagasi*)^{72, 73} conhecidos são as raposas e os marsupiais, sendo os cães considerados importantes hospedeiros domésticos. Há o histórico de duas espécies de raposas que foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus*, no Ceará⁷⁴, e *Cerdocyon thous*, no Pará⁷⁵ e em Minas Gerais⁷⁶; *L. (L.) infantum* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia⁷⁷ e no Rio de Janeiro⁷⁸.

Nas áreas endêmicas, em geral, há um maior número de casos em crianças devido ao estado de relativa imaturidade imunológica celular.

Infecções concomitantes são comuns (tuberculose, sarampo, brucelose, pneumonia), bem como a má-absorção de nutrientes, a desnutrição e a anemia, sendo estes fatores agravantes do quadro clínico. Recaídas após o tratamento são comuns. Imunossupressão com infecções oportunistas tendem a ocorrer nos casos mais graves e de maior tempo de evolução. A co-infecção pelo HIV é comum em algumas regiões, como nos países do Mediterrâneo, e vem ocorrendo com frequência crescente no Brasil. As mortes ocorrem geralmente devido às hemorragias, causadas pela anemia, e às infecções graças ao sistema imune comprometido⁷⁹.

É comum a ocorrência de lesões cutâneas após a cura clínica, chamadas de lesões pós-calazar.

2.8. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA, que inclui as manifestações Cutânea, Cutâneo-mucosa e Cutânea Difusa, também é conhecida como úlcera de Bauru, ferida-brava e calazar, entre outros nomes. Estima-se que 3 a 5% dos casos de LTA desenvolvam lesão mucosa¹¹. As manifestações da LTA são: lesões cutâneas indolores e ulceradas, únicas ou múltiplas, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica para as mucosas da nasofaringe com lesões agressivas e com destruição desses tecidos (manifestação da forma Cutâneo-mucosa). A frequência desta complicação vem sendo reduzida, provavelmente devido ao diagnóstico e tratamento precoces pelos centros de referência em controle e tratamento das Leishmanioses, como o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fiocruz do Rio de Janeiro. Estas lesões mucosas manifestam-se como lesões metastáticas, ulceradas, geralmente em mucosa nasal; são erosivas e quase nunca autolimitadas. Se não tratadas, podem desfigurar o paciente e mesmo levá-lo ao óbito por infecção secundária. Nas lesões cutâneas manifestadas pelo paciente com LTA, a carga parasitária na fase inicial da infecção é grande nas bordas, com tendência a diminuir ao longo do processo infeccioso⁸⁰ (Figuras 9 e 10). É comum observar sinais como edema e calor, diferindo assim a lesão da Leishmaniose de uma lesão causada por infecção bacteriana, apesar de poder haver infecção oportunista por bactérias e células leveduriformes, o que confere à lesão um aspecto purulento. A infecção oportunista pode causar dor no local da lesão²⁴. A LTA que apresenta lesões nodulares não ulceradas é classificada como forma difusa e denominada como Leishmaniose Cutânea Disseminada^{80, 81} (Figura 11). Tal forma difusa apresenta muitas úlceras, que são disseminadas pelas vias linfática ou hematogênica; esta forma é mais difícil de responder ao tratamento⁸².



Figura 9. Lesão única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.
 Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição (2007).



Figura 10. Lesão na língua.
 Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição (2007).



Figura 11. LTA difusa - Lesão com áreas descamativas na orelha.
 Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição (2007).

A LTA ocorre nas Américas, sendo seus principais agentes etiológicos as seguintes espécies de leishmânias: *Leishmania (L.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) guyanensis*, *L. (L.) lainsoni* e *L. (L.) panamensis*. Seu período de incubação no homem é, em média, de dois a três meses, podendo apresentar períodos mais curtos (duas semanas) e mais longos (dois anos). No novo contexto epidemiológico existente, vários fatores têm sido associados a um maior risco de se adquirir a doença; dentre eles, os fatores associados ao indivíduo - a resolução da infecção humana é dependente da resposta celular inata e adaptativa^{83, 84, 85, 86}. A resposta imune celular que se desenvolve com a infecção é duradoura. É provável que a manutenção da resposta imune celular específica por longos períodos após a cura se deva à permanência destes parasitos latentes no organismo do hospedeiro, um fenômeno referido como imunidade

concomitante. É possível isolar parasitos viáveis de cicatrizes de LTA em indivíduos curados há vários anos. Este fenômeno poderia explicar o aparecimento de recidivas tardias, assim como o surgimento da doença em pacientes imunocomprometidos, como no caso de pacientes portadores de HIV. A perda da eficiência da resposta imune levaria a uma quebra do equilíbrio entre parasito e hospedeiro, facilitando a multiplicação do protozoário e produzindo as lesões. A localização intracelular das formas amastigotas no hospedeiro mamífero determina que anticorpos sejam ineficazes para o controle da infecção. O diagnóstico pode ser feito através de teste cutâneo de Montenegro, isolamento em cultura e pelo exame microscópico de esfregaço ou aspirado (de medula óssea ou baço) corados pelo Giemsa ⁸⁷.

2.9. Diagnóstico De Infecção Natural:

A taxa de flebotomíneos naturalmente infectados nas áreas endêmicas, assim como a identificação correta da espécie de *Leishmania* que os infecta, é de primordial importância para epidemiologia das Leishmanioses. Para detecção da infecção dos flebotomíneos por *Leishmania*, o método mais utilizado sempre foi a dissecação do aparelho digestivo do díptero, seguido do exame microscópico entre lâmina e lamínula. Neste caso, a positividade das amostras deve ser confirmada com o isolamento do parasito em meio de cultura e/ou inoculação em animais de laboratório, uma vez que outros flagelados podem ser encontrados no trato digestivo destes insetos ^{88, 89}. Um fator limitante para esta técnica é a dificuldade de processar grande número de espécimes capturados nas áreas de elevada transmissibilidade ^{90, 91}, uma vez que o procedimento é laborioso e exige experiência e perícia técnica do profissional. A investigação de infecção natural por *Leishmania* através do uso do método convencional de dissecação de flebotomíneos fêmeas tem gerado taxas de infecção que variam de 0 a 9% ^{20, 92, 93, 94}, mas em geral estes índices se situam abaixo de 1% para as distintas áreas endêmicas investigadas tanto no Brasil como em outros países da América do Sul ^{95, 96, 97}.

Com a introdução de novas estratégias para identificação de infecção natural em flebotomíneos, estes índices vêm sofrendo considerável aumento. Métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido frequentemente utilizados em estudos para detecção de infecção natural e têm aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação de *Leishmania* spp. independente do número, estágio e localização do parasito no vetor ⁹⁷. Além de possibilitar maior rapidez na análise de uma grande amostragem ^{98, 99}, a técnica permite trabalhar com insetos mantidos a seco,

congelados ou conservados em etanol, sem interferir no desempenho da reação¹⁰⁰.

Ensaio diagnóstico utilizando a PCR têm sido desenvolvidos, baseados em diferentes alvos moleculares como: minicírculos do kDNA^{21, 62, 97, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107}, genes da subunidade menor do ribossomo^{101, 107}, seqüências espaçadoras do gene de mini-exon¹⁰⁸, seqüências subteloméricas e seqüências nucleares de cópia única, como o gene de citocromo b e gene da DNA polimerase α ^{105, 109}.

Entretanto é reconhecido que fatores adicionais influenciam na sensibilidade da PCR, como por exemplo, o método empregado para extração de DNA, o número de cópias do DNA alvo da amplificação, assim como a variabilidade genética do alvo selecionado. Existem evidências de que diferenças na eficiência de métodos de extração influenciam significativamente na sensibilidade do ensaio molecular. Além disso, o processo de “otimização” de um protocolo baseado na PCR deve resultar em uma combinação perfeita entre o DNA extraído (e conseqüentemente o método de extração) e as condições da PCR¹¹⁰.

A sensibilidade destes sistemas pode ser aumentada ainda mais quando são utilizadas como alvo de detecção do parasito, seqüências representadas em múltiplas cópias, tais como: DNA do cinetoplasto, genes de RNA ribossomal, genes de mini-exon ou outras seqüências repetidas do genoma de *Leishmania* spp. O emprego de regiões conservadas ou variáveis presentes nestes alvos permite adaptar a especificidade da PCR em nível de gênero, complexo, espécie ou até mesmo do isolado individual¹¹¹.

PITA-PEREIRA et al. (2005)⁶² descreveram um ensaio molecular por PCR direcionado para a detecção da região conservada do kDNA gênero *Leishmania*, seguido de hibridização não radioativa, para estimar índices de infecção em flebotomíneos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. A etapa de hibridização mostrou-se importante para o aumento da sensibilidade do ensaio de PCR, principalmente quando aplicado como ferramenta diagnóstica em insetos vetores, devido à complexidade do material biológico a ser analisado. Com esta abordagem foi verificado que a etapa de hibridização de produtos amplificados possibilitou um aumento de dez vezes na sensibilidade de detecção do método.

Os minicírculos de kDNA se tornam alvos ideais, pois possuem uma região de seqüência conservada (presente em todas as espécies de *Leishmania*) e uma região variável que permite discriminação acurada entre as diferentes espécies do parasito. Além disso, as moléculas de minicírculos estão representadas na rede de kDNA em torno de 10.000 cópias por célula de leishmânia, sendo o alvo molecular que apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos coletados

em áreas endêmicas. Um estudo realizado por BEZERRA-VASCONCELOS et al., (2011) ¹⁰⁹ corrobora a sensibilidade ótima do alvo de kDNA, através da comparação com outros genes presentes em diferentes números de cópias para a detecção e quantificação de *L. (L.) infantum* em amostras de *Lu. longipalpis*, por PCR em tempo real. Foram empregados os alvos kDNA, polimerase α (cópia única) e a subunidade ribossômica 18S, e os minicírculos do kDNA exibiram uma maior sensibilidade entre os genes testados.

A PCR tendo como alvo o kDNA, se torna uma importante ferramenta de detecção e tipagem das espécies de leishmânias detectadas, principalmente quando associada a outras metodologias, como RFLP ^{107, 112, 113, 114} e sequenciamento dos produtos amplificados ^{107, 115}.

2.10. Teste Rápido SandFly

O teste rápido SandFly foi desenvolvido em 2013 por uma linha de pesquisa entre Bio-Manguinhos, Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) e Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), ambos da Fundação Oswaldo Cruz.

Trata-se de um teste sorológico, atualmente sob processo de patente, e por este motivo os dados de confecção do teste não podem ser revelados.

Dada a necessidade de um método de investigação em campo de infecção natural de flebotomíneos por leishmânias, este teste rápido tem a capacidade de funcionar como ferramenta prática que permita a avaliação rápida do risco de ocorrência de Leishmanioses, permitindo assim o controle eficiente destes vetores nas áreas endêmicas através de programas de vigilância epidemiológica.

O teste rápido SandFly trata-se de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral que foi desenvolvido para ser utilizado em campo sem a necessidade de materiais laboratoriais específicos, sendo realizado rapidamente e de fácil entendimento.

Ele emprega uma combinação de anticorpos conjugados e antígenos específicos encontrados em amostra contendo antígeno de leishmânia. Em sequência, são ancorados através da ligação com anticorpos anti-leishmânia ligados à uma membrana (fase sólida).

O *pool* de flebotomíneos deve ser macerado com o tampão de lise e ser aplicado no orifício do teste, seguido pela adição do tampão de corrida, que propicia o fluxo lateral, promovendo a ligação dos antígenos (quando presentes na amostra) ao

conjugado e produzindo uma linha roxa/rosa na área do teste (T) caso positivo, e de controle (C). Após 15 minutos a leitura visual deve ser feita, observando-se a formação de somente uma linha (controle positivo) ou duas, que neste caso representa um resultado positivo para presença de leishmânias (Figuras 12 e 13). Após 25 minutos a leitura visual já não é mais válida, logo, para fins de registro de resultados recomenda-se tomar nota após 15 a 20 minutos.

O princípio deste teste rápido foi validado em laboratório e a concentração de 5.500 leishmânias foi considerada ideal para a leitura do teste por apresentar formação da linha T (positivo).



Figura 12. Exemplo de resultado negativo.

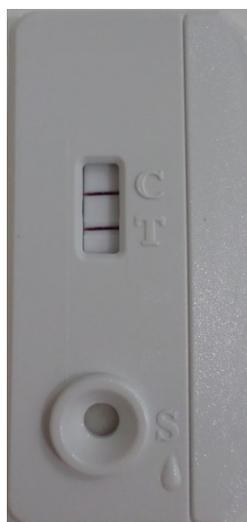


Figura 13. Exemplo de resultado positivo.

3. JUSTIFICATIVA

Entre os fatores que dificultam o controle das Leishmanioses está a diversidade das espécies de ambos: parasito e vetor. O conhecimento da densidade dos flebotomíneos e da incidência de infecção natural dos mesmos contribui para um maior entendimento da epidemiologia das Leishmanioses ¹¹.

Os métodos disponíveis para investigação da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* são a dissecação para visualização em microscopia e identificação do material genético por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ambos os métodos requerem que as amostras sejam analisadas em laboratórios, bem equipados, e por profissionais especializados ¹¹⁶. Neste contexto, a introdução de um teste rápido para a investigação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp., e principalmente por *Leishmania (L.) infantum* devido à gravidade de sua manifestação clínica pode funcionar como ferramenta prática que permita a avaliação rápida do risco de ocorrência das Leishmanioses, permitindo o controle eficiente destes vetores nas áreas endêmicas através de programas de vigilância epidemiológica ¹¹⁶.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o teste rápido SandFly tendo como padrão ouro a Reação em Cadeia da Polimerase, comparando a infecção natural por leishmânias em flebotomíneos coletados na Ilha da Marambaia, área do Estado do Rio de Janeiro com ocorrência de casos caninos e humanos de Leishmanioses.

4.1. Objetivos Específicos

- Avaliar as taxas de infecção natural nas diferentes espécies de flebotomíneos aplicando ensaios de PCR multiplex (para detecção simultânea de kDNA de *Leishmania* e do gene *cacophony* de flebotomíneos) e o teste rápido SandFly.

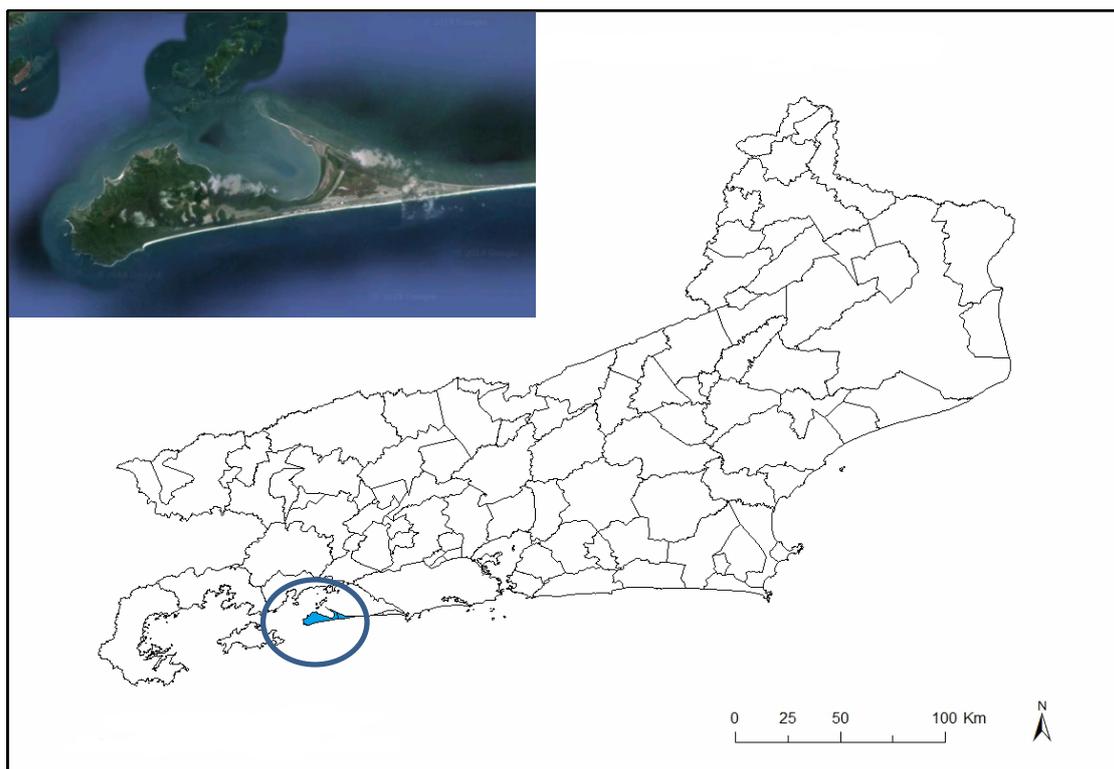
- Analisar a eficiência do teste rápido SandFly no diagnóstico de infecção natural de leishmânias comparando os resultados com os resultados obtidos na PCR, considerada padrão-ouro de detecção do parasita.

- Avaliar o teste rápido SandFly a partir dos resultados obtidos da comparação da avaliação de infecção natural deste com a PCR.

- Identificar as espécies de flebotomíneos coletados na Ilha da Marambaia que não foram direcionadas para a avaliação do teste rápido SandFly e PCR.

- Determinar as taxas de infecção natural nas diferentes espécies de flebotomíneos através do diagnóstico pela PCR multiplex (para detecção simultânea de kDNA de *Leishmania* e do gene *cacophony* de flebotomíneos) relacionando às áreas encontradas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS



Mapa 3. Local de coletas: Ilha de Marambaia.

Adaptado de: Google Earth

5.1. Ilha de Marambaia, Município de Mangaratiba – RJ.

O Estado do Rio de Janeiro apresenta diversas áreas com ocorrência de casos caninos de Leishmaniose Visceral (LVC), entre elas, a Ilha da Marambaia ¹¹⁷, que se localiza na entrada da Baía de Sepetiba, no Município de Mangaratiba, dentro da Baía da Ilha Grande no Estado do Rio de Janeiro (Mapa 3). Possui área total de 81 KM² compreendendo a ilha e a sua restinga ¹¹⁸. A Ilha da Marambaia é uma reserva ecológica que apresenta relevo e vegetação distintos, com áreas de praia, restinga, matas de encosta e mangues. É ocupada por uma comunidade quilombola (remanescente dos quilombos - descendentes de escravos) ¹¹⁷ e administrada pelo Exército, Aeronáutica e Marinha do Brasil, que executam experimentos armamentistas e exercícios militares ¹¹⁹.

A Ilha de Marambaia possui registros de LTA em humanos e LVC.

O registro da fauna flebotômica da Ilha da Marambaia foi feito pela primeira vez no ano de 2009 por Novo et al. (2013) ¹²⁰, que descreveram um total de treze espécies coletadas, cujas quais são: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Lutzomyia longipalpis*, *Evandromyia edwardsi*, *Pintomyia*

bianchigalatae, *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortellezii*, *Expapillata firmatoi*, *Micropygomyia capixaba*, *Micropygomyia quinquefer*, *Micropygomyia schreiberi* e *Psathyromyia pelloni*¹²⁰. As quatro primeiras espécies possuem importância epidemiológica relacionada à LTA e LVA.

A captura de 14 espécies de flebotomíneos na Ilha de Marambaia foi feita por Alonso et al. em 2010, que além das 13 espécies coletadas por Novo et al. em 2009, também capturaram *Psathyromyia pascalei*¹²¹.

Em 2012 Carmo et al.¹²² capturaram nove espécies de flebotomíneos, além de constatar infecção por *L. (L.) infantum* em cães em Marambaia¹²².

Lima et al.¹²³ capturaram 8 espécies de flebotomíneos no período de Julho de 2012 a Julho de 2013 em Marambaia. Em seu estudo foi constatada infecção natural por *L. (L.) infantum* em *Nyssomyia intermedia* e *Migoneimyia migonei*, mas não em *Lutzomyia longipalpis*¹²³.

Todos estes registros de coletas realizados na Ilha de Marambaia revelaram uma ampla distribuição de *N. intermedia*, seguido por *M. migonei*, e uma baixa densidade de *Lu. longipalpis*.

Em 2014 Souza et al.¹¹⁹ capturaram 10 espécies de flebotomíneos e registraram pela primeira vez a presença de *L. ferreirana* na Ilha de Marambaia¹²⁴.

5.2. Metodologia

A) Coleta de Flebotomíneos



Figura 14. Armadilha luminosa do tipo CDC no peridomicílio em Praia Grande.

Na Ilha da Marambaia foram realizadas capturas de flebotomíneos nos meses de Setembro e Outubro de 2014. As coletas se deram em cinco áreas distintas: Praia Grande, Praia de Caetana, Praia de São José e Praia da Cutuca, todas estas em peridomicílio, e Vacaria Velha (antigo curral, hoje em desuso) utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC (Figura 14). As armadilhas funcionaram no horário compreendido entre 19:00 h e 7:00 h da manhã seguinte (12 hr de coleta/ armadilha).

No primeiro mês, Setembro, três coletas foram realizadas em duas áreas: duas na Vacaria (Figuras 15, 16 e 17) e uma em Praia Grande (Figuras 18, 19 e 20). No segundo mês, Outubro, cinco coletas foram realizadas em quatro áreas: duas coletas foram realizadas em Praia Grande, uma na Praia de Caetana (Figuras 21 e 22), uma na Praia de São José (Figuras 23 e 24) e uma na Praia da Cutuca (Figura 25). No total, 8 coletas foram realizadas nas 5 áreas citadas.

Os dados relacionados às capturas de flebotomíneos, bem como os relacionados às condições atmosféricas foram registrados em fichas (Apêndice 3).

Vacaria



Figura 15. Paisagem da Vacaria.



Figura 16. Local de coleta: Vacaria. Ponto 1.



Figura 17. Local de coleta: Vacaria. Ponto 2.

Praia Grande



Figura 18. Paisagem do local de coleta: Praia Grande.



Figura 19. Local de coleta: Praia Grande. Ponto 1.



Figura 20. Local de coleta: Praia Grande. Ponto 2.

Praia de Caetana



Figura 21. Paisagem do local de coleta: Praia de Caetana.



Figura 22. Local de coleta: Praia de Caetana. Ponto 1.

Praia de São José

Figura 23. Paisagem do local de coleta: Praia de São José.



Figura 24. Local de coleta: Praia de São José. Ponto 1.

Praia da Cutuca



Figura 25. Local de coleta: Praia da Cutuca. Ponto 1.

B) Teste Rápido SandFly

Os kits fornecidos por Bio-Manguinhos continham tubos do tipo *eppendorf*, bastões para macerar, tampão de lise, tampão de corrida e os testes rápidos, ambos devidamente lacrados. Uma pipeta automática foi utilizada para a realização dos testes, possibilitando a fragmentação das amostras para realização do TR e PCR de modo a não haver contaminação (Figura 26).



Figura 26. Material utilizado em campo para realização dos testes rápidos.

Setembro: em campo, após cada coleta, os flebotomíneos foram triados por sexo. As fêmeas foram introduzidas em tubos do tipo *eppendorf* em *pools* de dez. Cada amostra foi rotulada. Cada *pool* foi macerado com o bastão fornecido no kit do teste rápido junto com 4 gotas (100 μ L) da solução Tampão de Lise. Metade de cada amostra (50 μ L) foi transferida para o orifício do teste rápido, identificado correspondente à amostra, e em seguida foram adicionadas 3 gotas do tampão de corrida. Dados de temperatura ambiente e umidade no momento da realização dos testes foram lidos com o auxílio de um termohigrômetro portátil (BTTHM2R Brasiterm, com medição de temperatura interna: -30 a 50°C; temperatura externa: -50 a 70°C e umidade: 20 a 99%; com precisão de temperatura: 0,1°C e umidade: 1%) e registrados em fichas anexas. Após 20 minutos foram realizadas as leituras visuais e feito o registro por meio de fotografias. Os resultados dos testes foram anotados em fixas (Apêndice 1). A realização dos testes foi feita em diferentes horários e foram observadas diferentes condições de temperatura e umidade ambiente. O restante das amostras em tubos rotulados (A01, A02, etc.) foi encaminhado para avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp. através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC.

Tabela 1. Setembro: Amostras direcionadas à realização dos testes rápidos das respectivas coletas em diferentes áreas de Marambaia; dados de durante a realização dos testes.

Nº da coleta	Flebotomíneos direcionados à realização dos testes e identificação das amostras	Período de realização dos testes	Condições de temperatura e umidade ambiente durante a realização
Coleta Nº1: Vacaria	Amostras: 70 fêmeas. 7 pools de 10 = 7 testes rápidos A01 a A07	4 testes pela manhã	Temperatura: 24.3°C a 24.5°C Umidade: 74%
		3 testes à tarde	Temperatura: 22.6°C a 22.7°C Umidade: 77%
Coleta Nº2: Praia Grande	Amostras: 220 fêmeas. 22 pools de 10 fêmeas = 22 testes rápidos A08 a A29	4 testes pela manhã	Temperatura: 24.6°C a 25.1°C Umidade: 64% a 68%
		18 testes à tarde	Temperatura: 26.1°C Umidade: 57%

No primeiro mês, 70 fêmeas da primeira coleta realizada na Vacaria foram direcionadas à realização dos testes, correspondendo a 7 testes rápidos. 4 testes foram realizados na parte da manhã e 3 à tarde (Tabela 1).

Da segunda coleta realizada em Praia Grande, 220 fêmeas foram direcionadas à realização dos testes, correspondendo a 22 testes. 4 testes foram feitos na parte da manhã e 18 à tarde (Tabela 1).

Totalizando, foram feitos 29 testes no primeiro mês. Durante a realização dos testes a temperatura variou entre 22.6°C e 26.1°C e a umidade variou entre 57% e 77% (Tabela 1). O restante dos flebotomíneos foi encaminhado para identificação de espécies no Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza da ENSP.

Devido ao uso de todos os testes rápidos disponíveis para Setembro, todos os flebotomíneos da coleta Nº3, oriundos de Vacaria, foram direcionados para identificação de espécies no Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza, da ENSP.

Observou-se uma intensa dificuldade em macerar o *pool* de flebotomíneos com o bastão fornecido no kit por Bio-Manguinhos. Sendo assim, optou-se por substituí-lo por ponteiros queimadas esterilizadas.

Outubro: em campo, exceto pela substituição dos bastões pelas ponteiros queimadas, a mesma metodologia foi seguida.

Neste segundo mês, 70 fêmeas da coleta N°4 realizada na Praia Grande foram direcionadas à realização dos testes, correspondendo a 7 testes rápidos. Todos foram realizados na parte da manhã (Tabela 2).

Das coletas realizadas na Praia de Caetana e na Praia de São José foram direcionadas 10 fêmeas de cada localidade para os testes, correspondendo a um único *pool* cada (Tabela 2).

Da coleta N°7, Praia da Cutuca, 9 testes rápidos foram realizados (9 *pools* de fêmeas e 1 *pool* de machos para controle negativo) (Tabela 2).

Da coleta N°8, 2 *pools* oriundos da Praia Grande foram direcionados à realização dos testes (Tabela 2).

Tabela 2. Outubro: Amostras direcionadas à realização dos testes rápidos das respectivas coletas em diferentes áreas de Marambaia; dados de durante a realização dos testes.

Nº da coleta	Flebotomíneos direcionados à realização dos testes e identificação das amostras	Período de Realização dos testes	Condições de temperatura e umidade ambiente durante a realização
Coleta N° 4: Praia Grande	Amostras: 70 fêmeas. 7 pools de 10 = 7 testes rápidos B01 a B07	7 testes pela manhã	Temperatura: 24.0°C a 25.1°C Umidade: 77 a 80%
Coleta N° 5: Praia de Caetana	Amostras: 10 fêmeas. 1 pool de 10 = 1 teste rápido B08	13 testes à tarde	Temperatura: 24.8°C a 25.1°C Umidade: 77%
Coleta N° 6: Praia de São José	Amostras: 10 fêmeas. 1 pool de 10 = 1 teste rápido B09		
Coleta N° 7: Praia da Cutuca	Amostras: 80 fêmeas e 10 machos. 9 pools de 10 = 9 testes rápidos B10 a B18		
Coleta N° 8: Praia Grande	Amostras: 20 fêmeas. 2 pools de 10 = 2 testes rápidos B19 e B20		

Totalizando, foram feitos 20 testes no segundo mês. Durante a realização dos testes a temperatura variou entre 24.0°C e 25.1°C e a umidade variou entre 77% e 80% (Tabela 2). O restante dos flebotomíneos foi encaminhado para identificação de espécies no Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza, da ENSP.

C) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Extração de DNA – A extração de DNA a partir de parte dos lisados (50 µL), foi realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA), segundo as especificações do fabricante e o DNA eluído em 100 µL TE 0,1X foi posteriormente estocado a - 20°C até o momento de uso. Todas as etapas para a extração de DNA foram monitoradas pela inclusão de amostras controle negativo (insetos machos capturados no campo). A inclusão de machos não infectados determina um controle a possíveis contaminações, pois essas amostras não podem conter DNA de *Leishmania* spp. Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro e exposição a raios UV.

Reação em Cadeia da Polimerase – Hot-start PCR multiplex – Para a PCR foram utilizados dois pares de primers que amplificaram simultaneamente em uma mesma reação, um produto de 120 pb referente ao kDNA de leishmânia (no caso de amostras de fêmeas positivas) e outro de 220 pb correspondente ao DNA de flebotomíneo (no caso de todas as amostras que contém machos e fêmeas). O primeiro par amplifica a região constante do minicírculo do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3']¹²⁵; o segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebotomíneos (cacophony): 5Llac [5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'] e 3Llac [5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3']¹²⁶. Eletroforese em gel de agarose: os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal com géis de agarose a 2,0 % preparados em TBE 1X, por 2hr à 70 V e corado com Nancy®. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP Bioimaging Systems.

D) Identificação Taxonômica

Após as coletas, os flebotomíneos capturados não direcionados ao diagnóstico de infecção por leishmânia foram introduzidos em frascos contendo álcool 70% e direcionados à identificação, feita no Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), no campus da Jacarepaguá. No laboratório, os flebotomíneos passaram por um processo de clarificação que consiste em serem deixados de molho em pequenas placas de Petri em 4 fases consecutivas: 1ª) em solução de hidróxido de potassa a 10% (KOH a 10%) durante 2 horas para que haja o amolecimento da quitina; 2ª) em ácido acético

10% por cerca de 20 minutos para retirar o excesso de hidróxido de potassa; 3ª) em água destilada por 20 minutos para serem lavados; 4ª) em lactofenol por 24 horas para diafanizar. Posteriormente, os exemplares foram introduzidos em lâminas para identificação de sexo e espécie com o auxílio de microscópio entomológico.

Os flebotomíneos foram identificados de acordo com a nomenclatura proposta por Galati, 2003¹²⁷.

6. RESULTADOS:

6.1. Resultados dos Testes Rápidos

Ao todo foram realizados 49 testes rápidos com flebotomíneos capturados em 8 coletas durante 2 meses consecutivos. 29 testes foram realizados em Setembro (Figuras 27 e 28) e 20 em Outubro (Figuras 30 e 31).



Figura 27. Testes Rápidos realizados em Setembro.



Figura 28. Testes Rápidos realizados em Setembro. (Continuação)

No primeiro mês, as leituras visuais nos testes rápidos revelaram apenas 1 resultado positivo fraco nos 29 realizados (amostra A13) (Figura 29). Este teste foi feito com flebotomíneos capturados na Praia Grande.

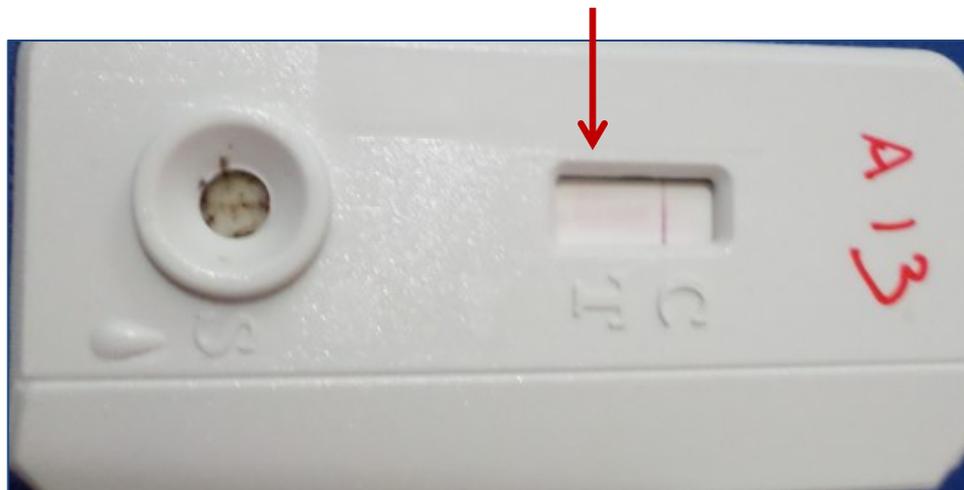


Figura 29. Amostra A13 - Resultado positivo.

No segundo mês, 20 testes rápidos foram realizados (Figuras 30 e 31).



Figura 30. Testes Rápidos realizados em Outubro.



Figura 31. Testes Rápidos realizados em Outubro. (Continuação)

Três testes rápidos dos 20 realizados apresentaram resultado positivo (Figuras 32, 33 e 34), todos sendo fracos (B11, B13 e B14). Estes três testes foram feitos com flebotomíneos capturados na Praia da Cutuca.

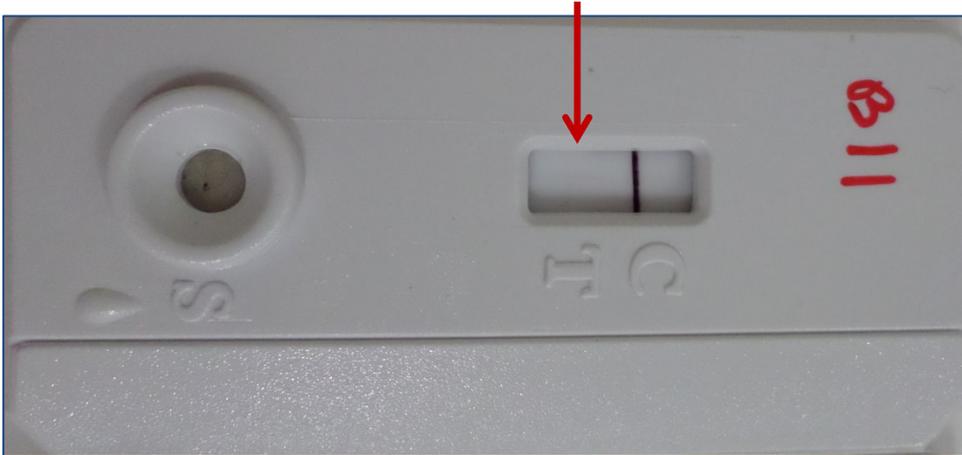


Figura 32. Amostra B11 - Resultado positivo.

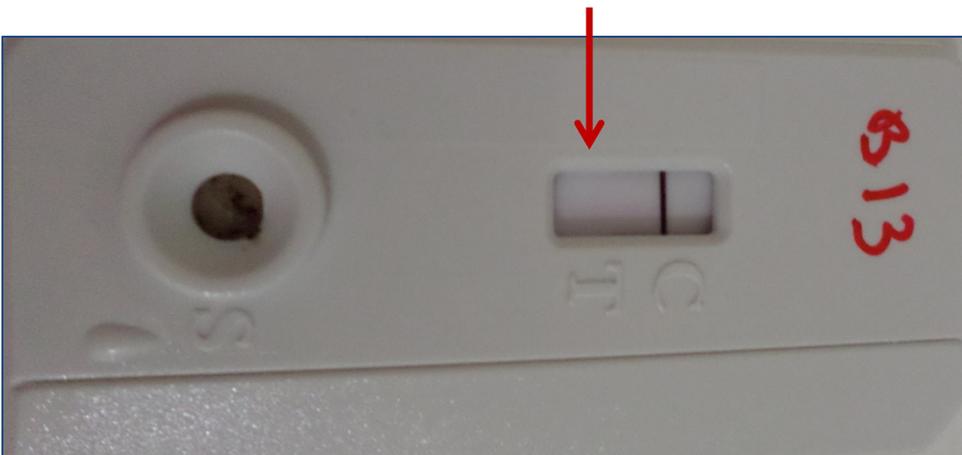


Figura 33. Amostra B13 - Resultado positivo.

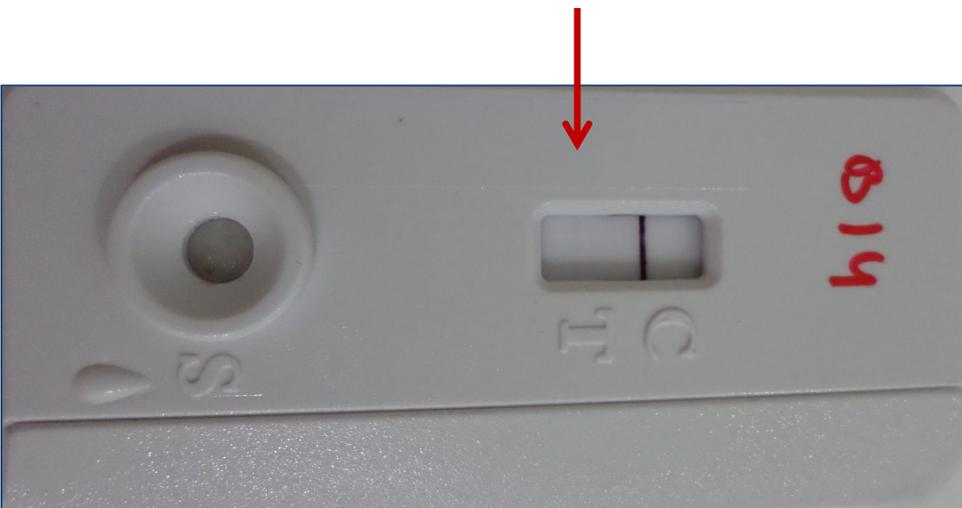


Figura 34. Amostra B14 - Resultado positivo.

6.2. Resultados da PCR

A PCR revelou 7 resultados positivos (Figura 35) nas 29 amostras do primeiro mês (A13, A17, A18, A19, A22, A23 e A24). Todos os resultados positivos foram de flebotomíneos oriundos de Praia Grande.

As taxas de infecção foram calculadas considerando 1 flebotomíneo infectado em cada *pool* de 10 espécimes. A fórmula para calcular é: Taxa mínima (TM) = N° de grupos positivos (*pools*) x 100/Total de flebotomíneos processados ¹⁰⁰.

A taxa mínima de infecção encontrada na Praia Grande em Setembro foi de 3,1%; a taxa mínima de infecção em Setembro foi de 2,4%.

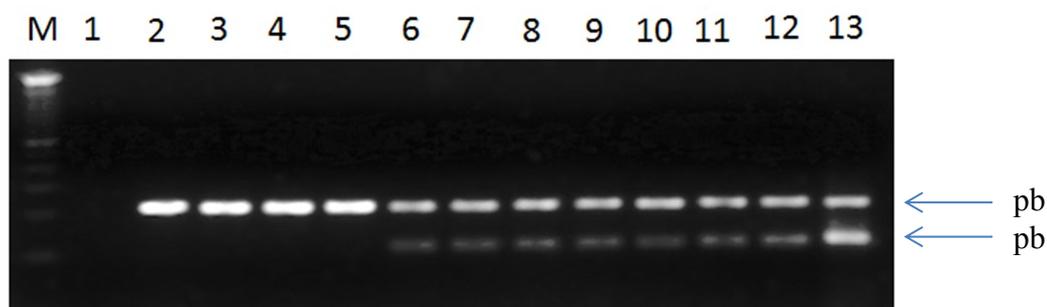


Figura 35. Gel demonstrativo dos resultados da PCR para avaliação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. referente às amostras de Setembro. M: Marcador de peso molecular 100 pb; 1: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 2-5: Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; 6-12: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular revelando positividade; 13: Controle positivo da reação (DNA de um *pool* de 10 flebotomíneos machos misturados com DNA de *L. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).

No segundo mês a PCR revelou 7 resultados positivos (Figura 36) nas 19 amostras com fêmeas de Outubro (B01, B02, B05, B06, B09, B13 e B17). Destes sete resultados positivos, 4 foram de flebotomíneos oriundos da Praia da Grande, 1 da Praia de São José (único *pool* desta área) e 2 da Praia da Cutuca.

A taxa mínima de infecção encontrada em Praia Grande em Outubro foi de 4,4%; a taxa mínima de infecção encontrada na Praia da Cutuca em Outubro foi de 2,5%; a taxa mínima de infecção em Outubro foi de 3,6%.

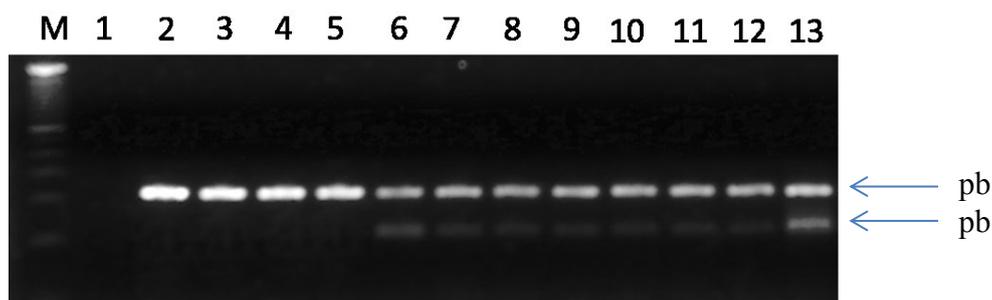


Figura 36. Gel demonstrativo dos resultados da PCR para avaliação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. referente às amostras de Outubro. M: Marcador de peso molecular 100 pb; 1: Controle negativo da reação de PCR (Mistura da reação sem DNA); 2-5: Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; 6-12: Fêmeas de flebotomíneos submetidas ao diagnóstico molecular revelando positividade; 13: Controle positivo da reação (DNA de um *pool* de 10 flebotomíneos machos misturados com DNA de *L. (V.) braziliensis* extraído de cultura celular).

A taxa mínima de infecção nos dois meses foi de 2,9%. A taxa mínima de infecção em Praia Grande nos dois meses foi 3,5% (Tabela 3).

Tabela 3. Taxas mínimas de infecção encontradas nas áreas de coletas em Marambaia realizadas em Setembro e Outubro de 2014.

Área	Pools	PCR +	Taxa mínima de infecção
Vacaria	7	-	-
Praia de Caetana	1	-	-
Praia de São José	1	1 +	10%
Praia Grande	31	11 +	3,5%
Praia da Cutuca	8	2 +	2,5%

6.3. Avaliação do Teste Rápido

Considerando a PCR como padrão-ouro, dos 49 testes realizados (1 *pool* serviu como controle negativo, com flebotomíneos machos): 2 revelaram ser verdadeiros positivos, 33 verdadeiros negativos, 2 falsos positivos e 12 falsos negativos (Tabela 4).

Os resultados foram analisados usando o programa BioEstat versão 5.3. Para verificar a concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o índice de concordância de Kappa (Tabela 5). A concordância ajustada Kappa (K) é um parâmetro que se baseia na comparação do índice de concordância esperada com o índice de concordância observada ¹²⁸. Esta concordância foi considerada fraca, com o valor de $k=0,1091$. A sensibilidade relativa encontrada foi de 14% e a especificidade relativa de 94,2%. O Valor Preditivo Positivo encontrado foi $VPP=0,50$ enquanto o Valor Preditivo Negativo foi $VPN=0,73$; a acurácia foi 0,71.

Tabela 4. Comparação dos resultados da PCR com os dos Testes Rápidos.

	PCR +	PCR -	
TESTE RÁPIDO +	2	2	4
TESTE RÁPIDO -	12	33	45
	14	35	49

$$\text{Sensibilidade relativa} = (a / (a + c))$$

$$2/14 = 0,1428 \cdot 100 = 14\%$$

$$\text{Especificidade relativa} = (d / (b + d))$$

$$33/35 = 0,9428 \cdot 100 = 94,2\%$$

$$VPP = (a / (a + b))$$

$$2/4 = 0,50$$

$$VPN = (d / (c + d))$$

$$33/45 = 0,73$$

$$\text{Acurácia} = (a + d / (a + b + c + d)) =$$

$$35 / 49 = 0,71$$

Kappa

$$P_o = (a+d) / (a+b+c+d) = 0,7143$$

$$P_e = [(a+b \cdot a+c) + (c+d \cdot b+d)] / (a+b+c+d) \cdot 2 = 0,6793$$

$$k = (P_o - P_e) / (1 - P_e) = 0,1091$$

(Conclusão da replicabilidade: concordância fraca)

Tabela 5. Escala de concordância do Kappa.

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

6.4. Identificação das Espécies

Totalizando, nos meses de Setembro e Outubro foram capturados 1.505 flebotomíneos, dos quais 490 foram direcionados à avaliação de infecção natural por *Leishmania* através do teste rápido SandFly e PCR e 42 fêmeas foram separadas para um posterior estudo sobre hábito alimentar; estes 532 flebotomíneos não foram identificados (Tabela 6).

Ao todo, 973 flebotomíneos foram identificados (Tabela 11), correspondendo a seis espécies: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. e *Micropygomyia capixaba* – as três primeiras espécies supracitadas apresentam importância epidemiológica nas Leishmanioses. Neste trabalho não foram identificados espécimes de *Lu. longipalpis*.

Tabela 6. Flebotomíneos não identificados.

Meses ▼	Nº da coleta e Local ▼	Diagnóstico de infecção natural pelo TR e PCR	Fêmeas ingurgitadas separadas	Totais ▼
Setembro	1. Vacaria	70		70
	2. Praia Grande	220	-	220
	3. Vacaria	-	-	-
Outubro	4. Praia Grande	70	-	70
	5. Praia de Caetana	10	02	12
	6. Praia de São José	10	-	10
	7. Praia da Cutuca	90	40	130
	8. Praia Grande	20	-	20
Totais ►		490	42	532

Tabela 7. Espécies capturadas em Setembro de 2014.

Espécies ► Nº da coleta e Local ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia</i> sp.	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	Não identificados	Totais ▼
1. Vacaria	20	01	01	-	-	-	70	92
2. Praia Grande	167	260	03	20	02	08	220	680
3. Vacaria	244	11	01	-	01	01	-	258
Totais ►	431	272	05	20	03	09	290	1030

Em Setembro 680 flebotomíneos foram coletados na Praia Grande. As coletas N°1 e N°3 realizadas na Vacaria em Setembro somaram 350 flebotomíneos. Totalizando, 1.030 flebotomíneos foram capturados em Setembro (Tabela 7); 70 fêmeas oriundas da Vacaria e 220 da Praia Grande foram direcionadas ao diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* através do teste rápido e PCR, não sendo identificadas. O restante foi direcionado à identificação de espécies.

Tabela 8. Espécies capturadas em Outubro de 2014.

Espécies ►								
Nº da coleta e Local ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia</i> sp.	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	Não identificados	Totais ▼
4. Praia Grande	13	37	02	-	03	-	70	125
5. Praia de Caetana	13	09	-	-	-	-	12	34
6. Praia de São José	05	10	-	-	-	-	10	25
7. Praia da Cutuca	32	69	-	03	02	01	130	237
8. Praia Grande	07	27	-	-	-	-	20	54
Totais ►	70	152	02	03	05	01	242	475

Em Outubro 179 flebotômíneos foram coletados na Praia Grande (somando as coletas Nº 4 e Nº8), 34 na Praia de Caetana, 25 na Praia de São José e 237 na Praia da Cutuca, totalizando 475 flebotômíneos (Tabela 8); 80 fêmeas e 10 machos (controle negativo) oriundos da Praia da Cutuca, 90 fêmeas oriundas da Praia Grande, 10 da Praia de Caetana e 10 da Praia de São José e foram direcionados ao diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* através do teste rápido e PCR, não sendo identificados. 42 fêmeas ingurgitadas (2 da Praia de Caetana e 40 da Praia da Cutuca) foram separadas para um posterior estudo sobre hábito alimentar (Tabela 6). O restante foi direcionado à identificação de espécies.

Tabela 9. Flebotomíneos identificados em Setembro.

Mês ▼	Espécies ► Nº da coleta e Local ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia</i> sp.	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	Totais ▼
Setembro	1. Vacaria	20	01	01	-	-	-	22
	2. Praia Grande	167	260	03	20	02	08	460
	3. Vacaria	244	11	01	-	01	01	258
Totais de Setembro ►		431	272	05	20	03	09	740

Em Setembro 740 flebotomíneos foram identificados (Tabela 9), correspondendo a 6 espécies: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. e *Micropygomyia capixaba*.

Tabela 10. Flebotomíneos identificados em Outubro.

Mês ▼	Espécies ► Nº da coleta e Local ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia</i> sp.	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	Totais ▼
Outubro	4. Praia Grande	13	37	02	-	03	-	55
	5. Praia de Caetana	13	09	-	-	-	-	22
	6. Praia de São José	05	10	-	-	-	-	15
	7. Praia da Cutuca	32	69	-	03	02	01	107
	8. Praia Grande	07	27	-	-	-	-	34
Totais de Outubro ►		70	152	02	03	05	01	233

Em Outubro 233 flebotomíneos foram identificados (Tabela 10), correspondendo às mesmas 6 espécies encontradas em Setembro.

Tabela 11. Total de flebotomíneos identificados.

<i>Espécies</i> ►							
<i>Local da coleta</i> ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia sp.</i>	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	<i>Totais</i> ▼
Praia Grande	187	324	05	20	05	08	549
Vacaria	264	12	02	-	01	01	280
Praia de Caetana	13	09	-	-	-	-	22
Praia de São José	05	10	-	-	-	-	15
Praia da Cutuca	32	69	-	03	02	01	107
Totais ►	501	424	07	23	08	10	973

A espécie *Nyssomyia intermedia* predominou na Vacaria (94,28%) e Praia de Caetana (59,09%), seguido por *Migoneimyia migonei* (4,28%) e (40,90%), respectivamente. Entretanto, nas áreas que tiveram *pools* positivos de infecção natural por *Leishmania* diagnosticados na PCR, Praia Grande, Praia de São José e Praia da Cutuca, observou-se que a quantidade de *M. migonei* foi maior que a de *Ny. intermedia* (Tabela 10). Na Praia Grande, *Ny. intermedia* correspondeu a 34,06% e *M. migonei* a 59,01%; na Praia de São José, *Ny. intermedia* correspondeu a 33,33% e *M. migonei* a 66,66%; Praia da Cutuca *Ny. intermedia* correspondeu a 29,90% e *M. migonei* a 64,48% dos flebotomíneos identificados.

Tabela 12. Espécies capturadas em Setembro e Outubro de 2014.

Meses ▼	Espécies ► Nº da coleta e Local ▼	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>	<i>Brumptomyia</i> sp.	<i>P. fischeri</i>	<i>E. edwardsi</i>	<i>M. capixaba</i>	Não identificados	Totais ▼
Setembro	1. Vacaria	20	01	01	-	-	-	70	92
	2. Praia Grande	167	260	03	20	02	08	220	680
	3. Vacaria	244	11	01	-	01	01	-	258
Outubro	4. Praia Grande	13	37	02	-	03	-	70	125
	5. Praia de Caetana	13	09	-	-	-	-	12	34
	6. Praia de São José	05	10	-	-	-	-	10	25
	7. Praia da Cutuca	32	69	-	03	02	01	130	237
	8. Praia Grande	07	27	-	-	-	-	20	54
Totais ►		501	424	07	23	08	10	532	1.505

Apesar de em Outubro ser realizada uma quantidade maior de coletas, o número de flebotomíneos capturados em Setembro (1.030) (Tabela 7) superou a quantidade de flebotomíneos capturados em Outubro (475) (Tabela 8). Dentre os 973 flebotomíneos identificados (Tabela 11) houve uma predominância de *Nyssomyia intermedia* (51,4%) e *Migoneimyia migonei* (43,5%); estas duas espécies representaram 95,0% dos flebotomíneos identificados em Setembro e Outubro.

Tabela 13. Espécies capturadas em Setembro e Outubro de 2014 – machos e fêmeas.

Meses ▼	Espécies ► Nº da coleta e Local ▼	<i>N.intermedia</i>		<i>M.migonei</i>		<i>Brumptomyia</i> sp.		<i>P. fischeri</i>		<i>M. capixaba</i>		<i>E. edwardsi</i>		Não identificados		Totais	
		Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Setembro	1.Vacaria	08	12	01	-	-	01	-	-	-	-	-	-	70	-	79	13
	2.Praia Grande	121	46	66	194	-	03	12	08	08	-	02	-	220	-	429	251
	3.Vacaria	97	147	07	04	-	01	-	-	01	-	01	-	-	-	106	152
Outubro	4.Praia Grande	03	10	07	30	01	01	-	-	-	-	03	-	70	-	84	41
	5.Praia de Caetana	02	11	03	06	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	17	17
	6.Praia de São José	02	03	01	09	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	13	12
	7. Praia da Cutuca	15	17	03	66	-	-	03	-	01	-	01	01	120	10	143	94
	8. Praia Grande	04	03	06	21	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	30	24
Totais		252	249	94	330	01	06	15	08	10	-	07	01	522	10	901	604

A quantidade de fêmeas correspondeu a 59,9% e a de machos a 40,1% dos flebotomíneos coletados. Apenas na coleta Nº 3 na Vacaria o número de machos superou o de fêmeas. 53% das fêmeas de cada coleta foram escolhidas ao acaso e direcionadas ao diagnóstico de infecção pela PCR e TR.

7. DISCUSSÃO

O levantamento da fauna flebotomínica da Ilha da Marambaia foi feito pela primeira vez no ano de 2009 por Novo et al. (2013)¹²⁰, que descreveram um total de treze espécies coletadas, sendo a *N. intermedia* encontrada em maior densidade (79,9%) e distribuída por toda a região, seguida por *M. migonei* (18,7%). A presença de *Lu. longipalpis* foi constatada em baixa densidade (menos de 0,4% dos flebotomíneos coletados).

Alonso et al.¹²¹ capturaram em 2010 na Ilha de Marambaia 14 espécies de flebotomíneos, inclusive *Psathyromyia pascalei* de que ainda não havia registro na região. Novamente *N. intermedia* foi a espécie predominante (80,37 %) seguida por *M. migonei* (18,2%). *Lu. longipalpis* correspondeu a 0,39% dos flebotomíneos capturados.

Em 2012 Carmo et al.¹²² capturaram nove espécies de flebotomíneos, constatando novamente a ampla distribuição de *N. intermedia* (81%) seguida por *M. migonei* (16%), assim como a baixa densidade de *Lu. longipalpis*, que representou menos de 1,6% dos flebotomíneos coletados, além de detectar 14,65% de cães 12soropositivos para LVC na Ilha da Marambaia no ano 2012.

Lima et al.¹²³ capturaram 8 espécies de flebotomíneos no período de Julho de 2012 a Julho de 2013 em Marambaia, 62,7% correspondendo a *N. intermedia*, 33,4% a *M. migonei* e 2,4% a *Lu. longipalpis*.

Todos estes registros de coletas realizados na Ilha de Marambaia revelaram uma ampla distribuição de *N. intermedia*, seguido por *M. migonei*, e uma baixa densidade de *Lu. longipalpis*.

No presente trabalho, foi coletado um total de 1505 espécimes de flebotomíneos. Apesar de em Outubro ser realizada uma quantidade maior de coletas, o número de flebotomíneos capturados em Setembro (1.030) superou a quantidade de flebotomíneos capturados em Outubro (475). Estes resultados corroboram com Novo et al (2013), que ao analisarem a sazonalidade das espécies de importância epidemiológica na transmissão das Leishmanioses capturadas na Ilha de Marambaia (*N. intermedia*, *M. migonei*, *P. fischeri* e *Lu. longipalpis*) concluíram que as quatro espécies, que juntas representaram 99,5% dos flebotomíneos capturados apresentaram maior densidade nos meses de estações frias e secas (abril, maio, junho, julho, agosto e setembro).

Para identificar as espécies de flebotomíneos utilizamos a nomenclatura de Galati (2003)¹²⁷. E dentre essas, 6 espécies foram identificadas: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. e

Micropygomyia capixaba. Não foram identificados espécimes de *Lutzomyia longipalpis*. Ao todo, as duas espécies mais abundantes foram *Nyssomyia intermedia*, correspondendo a 51,4% dos flebotomíneos identificados, seguido por *Migoneimyia migonei*, que correspondeu a 43,5%, corroborando todos os estudos realizados na área. Entretanto, notou-se que nas áreas que tiveram *pools* positivos de infecção natural por *Leishmania* diagnosticados pela PCR, Praia Grande, Praia de São José e Praia da Cutuca, a quantidade de *M. migonei* foi maior que a de *Ny. intermedia*. Na Praia Grande, *Ny. intermedia* correspondeu a 34,06% e *M. migonei* a 59,01%; na Praia de São José, *Ny. intermedia* correspondeu a 33,33% e *M. migonei* a 66,66%; Praia da Cutuca *Ny. intermedia* correspondeu a 29,90% e *M. migonei* a 64,48% dos flebotomíneos identificados.

Em nossa área de estudo (Ilha de Marambaia), Alonso et al. (2014) detectaram soroprevalência de 18,1% no grupo de cães da Ilha (121 cães, correspondentes a 99% dos cães da Ilha, desconsiderando os filhotes com idade inferior a três meses) e isolaram *L. (L.) infantum* em amostras com cultura positiva de 31,8% dos cães soropositivos. Nota-se que apesar da presença de casos contínuos de LVC (Leishmaniose Visceral Canina) na Ilha de Marambaia há registro de uma baixa densidade de *Lu. longipalpis*, que é o vetor da LV presente na região, ressaltando que em nosso estudo, nenhum exemplar foi identificado.

Cabe destacar que *Lu. longipalpis* é incriminado como vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil, mas apenas baseado em evidências epidemiológicas no Estado do Rio de Janeiro^{57, 129, 130}. Tudo isto corrobora na ideia de que outras espécies de flebotomíneos ainda não comprovadas possam estar atuando na transmissão de *L. (L.) infantum* em áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral em que não são encontrados os vetores conhecidos, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, ou são encontrados em baixa densidade. Existem trabalhos que mostram que a espécie *M. migonei* tem sido sugerida como possível vetor de *L. (L.) infantum*, em La Banda, na Argentina¹³¹ e no Estado de Pernambuco¹⁰⁶.

A determinação de infecção natural para identificação de espécies vetoras, sobretudo nas regiões endêmicas, e a identificação correta da espécie de leishmânia em uma determinada espécie de flebotomíneo são de grande importância na epidemiologia das Leishmanioses¹³². Sendo assim, 53% do total das fêmeas de cada coleta foram escolhidas ao acaso e direcionadas ao diagnóstico de infecção natural pela PCR e Teste Rápido. 49 *pools* contendo 10 flebotomíneos foram analisados.

Segundo Killick-Kendrick (1990)¹³³, existem critérios que devem ser

obedecidos para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetora de Leishmanioses. Critérios essenciais correspondem ao grau de antropofilia; distribuição espacial coincidente com a área geográfica de ocorrência de casos de infecção humana; infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania*, identificados como pertencentes à mesma espécie que infecta o homem na mesma área geográfica, além de critérios complementares que avaliam a capacidade de desenvolvimento do parasito nas fêmeas de flebotomíneos infectadas experimentalmente, assim como a capacidade destas se infectarem e transmitirem o parasito através da picada. Porém, sendo os critérios essenciais determinados, é possível sugerir o potencial papel vetorial de uma determinada espécie de flebotomíneo. Desta forma, o diagnóstico de infecção natural entra como uma ferramenta complementar em estudos de fauna flebotomínica e a utilização de um possível teste rápido diretamente no campo e que forneça algumas informações quanto ao índice de infecção pode funcionar como ferramenta prática que permita a avaliação rápida do risco de ocorrência das Leishmanioses, permitindo o controle eficiente destes vetores nas áreas endêmicas através de programas de vigilância epidemiológica.

Neste contexto, a PCR entra como uma ferramenta importante para a avaliação da viabilidade da utilização deste teste, sendo uma metodologia amplamente utilizada nos últimos anos para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos coletados em diferentes áreas endêmicas do Brasil ^{21, 62, 111}, constituindo nosso padrão ouro de detecção do parasito nos flebotomíneos coletados. As principais vantagens do uso da PCR consistem na sua maior sensibilidade e especificidade comparada aos métodos convencionais, possibilitando a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasito ¹³⁴; além da rapidez do diagnóstico quando uma grande amostragem de flebotomíneos precisa ser avaliada ^{98, 99}. Para isso se faz necessária a escolha de um alvo molecular adequado que confira uma maior sensibilidade e especificidade de detecção do parasito. Neste sentido, os minicírculos que fazem parte da rede de kDNA dos parasitos do gênero *Leishmania*, estão presentes em cerca de 10.000 cópias por rede e possuem em comum uma única região de seqüência conservada. O fato dessas moléculas estarem presentes em múltiplas cópias no genoma mitocondrial, aliado à presença de uma região de seqüência conservada evolutivamente nas diferentes espécies do gênero *Leishmania*, as tornam um excelente alvo molecular para estudos diagnósticos, clínicos e epidemiológicos das Leishmanioses.

O diagnóstico de infecção natural através da PCR revelou 7 resultados positivos nas 29 amostras de Setembro, sendo todos estes *pools* positivos de flebotomíneos capturados em Praia Grande. A taxa mínima de infecção encontrada na Praia Grande em Setembro foi de 3,1% e a taxa mínima de infecção em Setembro foi de 2,4%. Em Outubro a PCR revelou 7 resultados positivos nas 19 amostras com fêmeas, sendo 4 de flebotomíneos capturados na Praia da Grande, 1 da Praia de São José (único *pool* desta área) e 2 da Praia da Cutuca. A taxa mínima de infecção encontrada em Praia Grande em Outubro foi de 4,4% e a taxa mínima de infecção encontrada na Praia da Cutuca em Outubro foi de 2,5%. A taxa mínima de infecção em Outubro foi de 3,6%. A taxa mínima de infecção nos dois meses foi de 2,9% e a taxa mínima de infecção em Praia Grande nos dois meses foi 3,5%. As amostras tiveram suas reações de PCR e eletroforese repetidas para confirmação do resultado. Cabe ressaltar que a taxa de infecção encontrada em Praia Grande é considerada alta em relação à descrita na literatura e carece de mais investigações na área. A espécie predominante identificada nesta área foi *M. migonei*, correspondendo a 59,01%, seguido por *Ny. Intermedia*, que correspondeu a 34,06%.

Lima et al (2014) investigou infecção natural por leishmânia em *L. intermedia*, *M. migonei* e *Lu. longipalpis* capturados na Ilha de Marambaia. Dos 1622 flebotomíneos coletados, estas espécies foram agrupadas em 51 *pools* de *L. intermedia*, 16 de *L. migonei*, todos estes *pools* com 10 flebotomíneos, e 1 *pool* de *Lu. longipalpis* com apenas 6 exemplares. A PCR convencional e a PCR em tempo real revelaram infecção natural por *L. (L.) infantum* em *N. intermedia* (3 *pools* positivos) e *M. migonei* (1 *pool* positivo) e em *N. intermedia* por *Leishmania* spp. (2 *pools* positivos), não encontrando infecção natural em *Lu. longipalpis*. A taxa mínima de infecção por *L. (L.) infantum* em *N. intermedia* e *M. migonei* encontrada foi de 0,6% e a taxa mínima de infecção encontrada em *N. intermedia* e *M. migonei* por *Leishmania* spp. foi de menos de 1%.

Baseando-se nos fatos de que existe registro de infecção de *Leishmania* spp. e *L. (L.) infantum* em *N. intermedia* e *M. migonei* capturados na Ilha de Marambaia¹²³, e que diversos trabalhos anteriores realizados na Ilha demonstram uma baixa densidade de *Lu. longipalpis* além do predomínio de *N. intermedia* e *M. migonei*, pode-se concluir que a alta taxa de infecção por *Leishmania* spp. encontrada nos flebotomíneos capturados na Praia Grande está provavelmente relacionada a outras espécies que não *Lu. longipalpis*.

A Ilha da Marambaia pertence ao município de Mangaratiba, que é considerado endêmico para LTA¹²¹. Segundo Alonso et al, em Marambaia houve a notificação de

um caso Leishmaniose Cutâneo-mucosa (1996) e dois casos de LTA (2002) em humanos. Entretanto não há registro de casos humanos de LVA na Ilha, mas apenas de LVC. Segundo Souza et al. 2003, na zona oeste do município do Rio de Janeiro a LVC é encontrada por anos sem o registro de casos humanos, o que também pode estar relacionado a participação de outro flebotomíneo no ciclo de transmissão com hábitos alimentares direcionados para os cães e outros animais ¹²⁹.

Em relação aos resultados obtidos no teste rápido foram 4 resultados positivos nos 49 *pools* analisados, todos sendo fracos. Em alguns testes realizados em Outubro observou-se que ao invés de aparecer uma ou duas linhas horizontais (no caso de ser positivo), o teste manchava como se corassem linhas verticais. Por este motivo, foi decidido utilizar um *pool* de machos para controle negativo do teste. O TR utilizando o *pool* com flebotomíneos machos também manchou. Logo, os testes que foram registrados anteriormente como resultados incertos devido às manchas foram considerados negativos. Na realização dos testes rápidos, as linhas de controle positivo do teste (C) apareceram bem visíveis. Entretanto as linhas de resultado positivo (T) apareceram bastante fracas em todos os 4 resultados positivos, causando dúvida e insegurança na leitura dos resultados. Esta leitura “dúbia” pode contribuir para explicar a baixa sensibilidade e os resultados falsos positivos.

Os resultados dos testes rápidos foram comparados aos resultados da PCR, considerada como o padrão-ouro neste trabalho. A sensibilidade e especificidade comparadas (também conhecidas por co-positividade e co-negatividade), assim como o Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) foram calculados. A estatística Kappa (k) foi utilizada para observar a concordância entre os métodos de diagnóstico. Cabe ressaltar que a PCR é uma técnica que apresenta uma alta sensibilidade e utiliza como alvo a região conservada do minicírculo do kDNA, presente em cerca de 10.000 cópias por parasito, o que aumenta ainda mais a sensibilidade da técnica, e por este motivo, um teste sorológico pode ser incapaz de alcançar a mesma sensibilidade.

Após a comparação dos resultados dos testes rápidos com os obtidos na PCR (padrão-ouro) foi feita a avaliação dos testes como nova opção de diagnóstico de infecção em flebotomíneos por *Leishmania* spp..

Dos 49 testes realizados: 2 revelaram ser verdadeiros positivos, 33 verdadeiros negativos, 2 falsos positivos e 12 falsos negativos. Os resultados foram analisados usando o programa BioEstat versão 5.3. Para verificar a concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o índice de concordância de Kappa. Esta concordância foi

considerada fraca, com o valor de $k=0,1091$. A sensibilidade relativa encontrada foi de 14% e a especificidade relativa de 94,2%. O Valor Preditivo Positivo encontrado foi $VPP=0,50$ enquanto o Valor Preditivo Negativo foi $VPN=0,73$; a acurácia foi 0,71.

A análise estatística dos resultados revelou que o teste rápido SandFly possui uma especificidade boa, mas necessita de melhoria na sensibilidade. O fato de que as fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*¹⁰⁰, e que podem ter reagido com as proteínas utilizadas no teste, visto que as técnicas moleculares como a PCR tem aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação do parasita¹³⁵ podem explicar os dois resultados falsos positivos obtidos.

Apesar do N de amostras analisadas ter sido relativamente baixo, o N de infecção natural encontrado foi alto, possibilitando a avaliação do TR.

Um fator importante que pode estar relacionado à baixa sensibilidade é a de que a quantidade padronizada de detecção de parasitos pelo TR pode não coincidir com a quantidade de parasitos em flebotomíneos infectados em campo. Ademais, cabe lembrar que as amostras foram divididas para o diagnóstico pela PCR, o que pode ter minimizado a sensibilidade encontrada no TR.

A dificuldade no maceramento dos *pools* de flebotomíneos representou um possível importante viés e pode também explicar a baixa sensibilidade no TR. Ajustes devem ser feitos na técnica de maceramento. A qualidade da visualização da linha T deve ser melhorada. Apesar destes aspectos que influenciaram na sensibilidade do TR, ele foi capaz de detectar 2 positivos em 14 amostras positivas, mostrando um potencial para sua utilização futura.

Não houve tempo hábil para a identificação das leishmânias positivas na PCR em nível de espécie; sendo identificadas até o gênero *Leishmania*. O sequenciamento será feito posteriormente.

Após a realização deste trabalho entende-se que, após as melhorias sugeridas, este TR pode funcionar como ferramenta prática que permitirá a avaliação rápida em campo do risco de ocorrência das Leishmanioses, funcionando como forma de triagem para *Leishmania* spp. em áreas potencialmente produtoras de Leishmanioses.

8. CONCLUSÃO

- O diagnóstico de infecção natural por leishmânias através da técnica de PCR revelou 7 resultados positivos nas amostras do primeiro mês e 7 nas amostras do segundo, totalizando 14 resultados positivos. Os testes rápidos revelaram 1 resultado positivo no primeiro mês e 3 no segundo, totalizando 4 resultados positivos. Entretanto, apenas dois resultados positivos coincidiram na PCR e teste rápido.

- Os cálculos feitos revelaram a sensibilidade comparada dos testes rápidos com a PCR de 14%. A especificidade comparada encontrada foi de 94,2%. O valor encontrado para o VPP = 0,50 e para o VPN= 0,73. A acurácia= 0,71. A estatística Kappa k= 0,1091.

- O resultado da estatística Kappa revelou a conclusão da replicabilidade: o teste rápido SandFly possui concordância fraca considerando a PCR como padrão ouro. Embora a especificidade do teste seja boa, a sensibilidade deve ser melhorada.

- Neste trabalho, 6 espécies foram identificadas: *Nyssomyia intermedia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Brumptomyia* sp. e *Micropygomyia capixaba*. A identificação dos flebotomíneos não direcionados ao diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* concordou com os trabalhos realizados anteriormente na Ilha de Marambaia, demonstrando o predomínio de *N. intermedia*, seguido por *M. migonei*, espécies de importância epidemiológica para LTA. Contudo, em todas as áreas que tiveram *pools* positivos diagnosticados na PCR (Praia Grande, Praia de São José e Praia da Cutuca), a quantidade de flebotomíneos identificados correspondentes a *M. migonei* foi maior que a de *N. intermedia*.

- Este trabalho registrou pela primeira vez infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos relacionada a diferentes áreas em Marambaia. O diagnóstico feito pela PCR revelou resultados positivos em 3 áreas na Ilha de Marambaia: Praia Grande, Praia de São José e Praia da Cutuca. As taxas de infecção encontradas em ambas as áreas foram relevantes. O único *pool* analisado da Praia de São José foi positivo, a taxa mínima de infecção encontrada na Praia da Cutuca foi de 2,5% e a taxa mínima de infecção encontrada em Praia Grande foi de 3,5%, considerada alta em relação à descrita na literatura, carecendo de mais investigações.

9. PERSPECTIVAS

Dada a necessidade de um método de investigação de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp., de fácil execução e baixos custos que ajude a vigilância epidemiológica do controle vetorial das Leishmanioses, a melhoria da sensibilidade do teste rápido SandFly e sua validação em campo apontam para um avanço significativo no combate a estas doenças negligenciadas.

As coletas e a realização dos testes rápidos e PCR deverão continuar a serem realizadas em colaboração entre o Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza da (ENSP), Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC e Bio-Manguinhos. As capturas deverão seguir nas áreas de resultados positivos obtidos na PCR direcionados ao diagnóstico, principalmente na Praia Grande.

Dando continuidade a este trabalho de investigação de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* na Ilha de Marambaia, deverão ser identificadas as espécies de flebotomíneos com o objetivo de correlacioná-las com as taxas de infecção.

Após as etapas da hibridização e da identificação das leishmânias positivas na PCR em nível de espécie através do sequenciamento serem concluídas, o artigo referente à alta taxa de infecção encontrada neste trabalho será submetido à publicação.

10. REFERÊNCIAS

1. Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 71-80.
2. Mota LAA, Miranda RR. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. Arq. Int. Otorrinolaringol. São Paulo. 2011; 15 (3): 376-381.
3. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
4. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press. London. 1987; 1: 1-120.
5. Lainson R, Shaw JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonia, Brazil. J Braz Ass Adv Sci. 1992; 94: 94-106.
6. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The neotropical *Leishmania* species. In Microbiology Infections. Ed. Topley & Wilson. 1998; 9 (13): 241-266.
7. Forattini OP, editor. Entomologia Médica. São Paulo: Edgard Blücher Ltda; 1973.
8. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE. 2012; 7 (5): e35671.
9. Secretaria de Vigilância em Saúde. II Fórum de Discussão sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina - Relatório Final, Brasília/DF - 01 E 02/10/2009.
10. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the Second 10 years. Clinical Microbiology Reviews. 2008; 21 (2): 334-359.

11. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
12. Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd* 1934; 48: 949-50.
13. Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. Rio de Janeiro. 1955; 47: 75-87.
14. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.
15. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 27(5): 305-318.
16. Bailey M, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007; 25:203-211.
17. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull Brit Mus (Nat Hist) Ent Ser* 1982; 45: 121-209.
18. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 1994; 54: 881.
19. World Health Organization (WHO). [online]. Leishmaniasis. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
20. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malaco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998; 12: 315-317.

21. Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. 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 Trop.* 2008; 107: 66-69.
22. Ross, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal.* 1903; 2: 1261-1262.
23. Chance ML. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: *Leishmaniasis*. 1nd ed. Chang MP, Bray RS. Elsevier Science Publishing Company, Inc. USA; 1985.
24. Focaccia RV et al. *Tratado de Infectologia*. 4. ed. São Paulo; 2010.
25. World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, Março de 2010.
26. Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press 1979; 1-116.
27. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée.* 1990; 65: 111-125.
28. Fernandes O, Murthy VK, Kurah U, Degrave W, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66: 261-271.
29. Noyes HA, Arana BA, Chance ML, Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J. Eukaryot. Microbiol* 1997; 44: 511-517.

30. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi JrG. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 2000; 16: 1-5.
31. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 15.
32. Ranque P. Études morphologique et biologique de quelques trypanosomatides récoltés au Sénégal. [Tese de Doutorado] Universidade Aix-Marseille, França. 1973.
33. Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I, Righton LA. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80 (1): 138-42.
34. Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LRN, Naiff MF, Pereira LOR, Oliveira-Neto MP, Falqueto A, Grimaldi GJ. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 57-60.
35. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2010; 26: 466-469.
36. Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 9944-8.
37. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania*. *Veterinary Parasitology*. 2002; 106: 181-191.
38. Baneth G, Koutinas A, Solano-Gallego LB, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 2008; 24 (7), 324-330.

39. Andrade CR, Kido ÉA, Luna LKS, Melo MA, Andrade PP, Balbino VQ. Leishmanioses: Manual *on-line*. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). [Internet]. 2006. Disponível em: https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/sumario.htm.
40. Aragão HB. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. Bras Med 1922; 36:129-130.
41. Forattini OP. Nota sobre o encontro de leishmanias em roedores silvestres de zona endêmica de leishmaniose no Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Paul. Méd. São Paulo, 1958; 53 (2): 155.
42. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
43. Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro, 8ª ed. Guanabara Koogan 1991; 706-17.
44. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). [Internet]. 2013. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
45. World Health Organization (WHO). TDR: For Research on diseases of Poverty – Leishmaniasis: 2012. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>.
46. Hsia R, Wang NE, Halpern J. Leishmaniasis. eMedicine Specialties. Emergency medicine. Infectious disease. USA. 2005. Disponível em: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic296.htm>. Acesso em: 19 de outubro de 2006.
47. TDR - The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease Information. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Acesso em: 09 de setembro de 2006.

48. Alcântara AC. ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania* sp. em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia. [Dissertação de mestrado] Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Bahia, Brasil. 126p. Aprovada em Agosto de 2006.
49. Aragão HB. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos phlebótomos Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1927; 20:177-87.
50. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Relatório do grupo de trabalho coordenador das atividades de estudos e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana na área de atuação do Posto Samuel Libânio (Jacarepaguá), Rio de Janeiro. 1974; 25.
51. Barreto MP. Catálogo dos Flebótomos americanos. Arq. Zool. S. Paulo. 1947; 5 (4): 177-242.
52. Guimarães FN, Bustamante FM de. A aplicação domiciliar de DDT como base da profilaxia das leishmanioses. Estudo de um foco de leishmaniose muco-cutânea cinco anos depois da aspersão periódica com aquele inseticida. Rev. Bras. Malariol. 1954; 6: 127-130.
53. Guimarães FN. Estudo de um foco de leishmaniose muco-cutânea na baixada fluminense (Estado do Rio de Janeiro). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1955; 53: 1-11.
54. Barretto MP, Zago Filho H. Flebótomos encontrados em Petrópolis, RJ, com descrição de uma nova espécie (Diptera, Psychodidae). Rev. Bras. Entomol. 1956; 5: 177- 186.
55. Martins AV, Godoy Junior TL, Silva JE. Nota sôbre os flebótomos de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, com a descrição de uma nova espécie (Diptera, Psychodidae).. Revista Brasileira de Biologia. 1962a; 22: 55-60.

56. Martins AV, Godoy Junior TL, Silva JE. Uma nova espécie de flebótomo dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo – *Lutzomyia gasparviannai* n. sp. (Diptera, Psychodidae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1962b; 4: 85–90.
57. Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Rangel Filho FB. Leishmaniose visceral na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 1985; 1:5-17.
58. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Leishmaniose Tegumentar Americana: Vigilância e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar em Unidades Territoriais-Brasil, 1994-2001. Boletim Eletrônico, Ano 02, Nº 05. Brasília. 2002. Disponível em:
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDYQFjAB&url=http%3A%2F%2Fbvvsms.saude.gov.br%2Fbvvs%2Fperiodicos%2Fboletim_eletronico_epi_ano02_n05.pdf&ei=eDUcVdf3NqjlsAT22YLoDQ&usg=AFQjCNEfEDZWumLYvg9ar4eQwNbtAP-iQ&bvm=bv.89744112,d.cWc&cad=rja.
59. Kawa H, Sabroza PC. Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro. Cad Saúde Pública 2002; 18:853-65.
60. Souza MA, Sabroza PC, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJC. Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. 1-Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981; 76: 161-8.
61. Lima CL. Ruralização da *Lutzomyia intermedia*: Um provável caso de pré-adaptação. Rev de Saúde Pública 1986; 20: 102-104.
62. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005; 99: 905-913.

63. Rangel EF, Souza NA, Wemerllinger ED, Barbosa AF. Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of visceral leishmaniasis of Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 395-6.
64. Barreto MP. Observções sobre a biologia, em condições naturais, dos Flebótomos do Estado de S. Paulo. [Tese de Livre Docência] Faculdade de Medicina da USP. S. Paulo. 162p. 1943.
65. Forattini OP. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). Arch Hyg Saúde Publ. 1960; 25: 209-215.
66. Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. Rev Saúde Pública. 1983; 17: 23-30.
67. Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos de leishmaniose tegumentar americana. 5-Estratificação da atividade espacial e estacional de phlebotominae (Díptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região de Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1987; 82: 467-473.
68. Pessoa SB, Barreto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Educação e Saúde. Rio de Janeiro. 1948; 527.
69. Martins AV, Barreto, MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1956; 8: 577-581.
70. Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Act. Trop. 2002; 81: 143-150.

71. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
72. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999 Sep; 119 (3): 237-46.
73. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G: Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5 (6): e1155.
74. Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro; 1956.
75. Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 135-7.
76. Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Rec* 2000; 147: 421-2.
77. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 511.
78. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AV et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Trop S Paulo* 2003; 45: 79-83.

79. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003; 31: 174-177.
80. Neves DP *et al.* *Parasitologia Humana*. 11. Ed. São Paulo, 2005; 47-64.
81. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Londres. 2010; 8: 419-433.
82. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005; 816.
83. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993; 91: 1390-1395.
84. Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 1994; 62 (6): 2614-2618.
85. Carvalho EM, Filho DC, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 53 (3): 273-277.
86. Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De-Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L, Mc-Mahon-Pratt D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. 1996; 84 (2): 144-155.
87. Escobar MA, Smith DS, Palma GI. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): A diagnostic challenge. *Tropica Doctor*. 1992; 22: 69-78.

88. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. Sept. 1994; 2246-2252.
89. Silva OS, Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; Sep-Oct; 94 (5): 579-82.
90. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66 (5): 1933-1938.
91. Perez JE et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2007; 102 (5): 655-658.
92. Ryan L, Brazil RP. *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of São Luis, Maranhão State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1984; 79, 383–384.
93. Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Pova MM, DE Freitas RA, Biancardi CB, Castellon EG. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* Nov. 1985; 34 (6): 1098-108.
94. Gonçalves MD, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. The retained capacity of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) to transmit *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas) after eight years (64 generations) in a closed laboratory colony. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985; 80 (3): 337-89.

95. Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Da Rocha HC, Garcia WB. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 1996; 30 (2): 115-28.
96. Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94 (6): 623-319.
97. Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. Natural Leishmania infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Mar-Apr 1994; 88 (2): 161-4.
98. Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, Oxford. 1989; 99: 125-146.
99. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44 (5): 255-9.
100. Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafrente RS. 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*. Rio de Janeiro. 2007; 23: 87-94.
101. El Tai NO, Osman OF, El Fari M., Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2000; 94: 575-579.

102. Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandeso, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. Mar 2002; 97 (2): 185-8.
103. Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. 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 PCR assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2009; 80 (4): 593-595.
104. Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *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 Trop. 2011 Dec; 120 (3): 273-5. Epub Sep 16, 2011.
105. Souza-Rocha L, Santos CB, Falqueto A, Grimaldi GJ, Cupolillo E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil Parasitol Res. 2010; 107:465–468.
106. Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Trop 2010; 116:108-10.
107. Rassi Y, Dehkordi AS, Oshaghi MA, Abai MR, Mohtarami F, Enayati A, Zarei Z, Javadian E. First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in northwestern Iran. Experimental Parasitology. 2012; 131: 344–349.

108. Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafronte RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*. 2006; 99: 252-259.
109. Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MCS, Bevilaqua CML. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods *Experimental Parasitology* 2011; 129: 234–239.
110. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microb*. 2008; 46 (6): 1897-900.
111. Pita-Pereira D. Avaliação de infecção natural de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. empregando ensaios de PCR multiplex e PCR em tempo real. [Tese de Doutorado] Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. Aprovada em 2010.
112. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. *Acta trop.* (Basel). 2004; 90: 31-37.
113. Tojal AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006 Sep; 11 (9): 1388-98.
114. Rocha MN, Margonari C, Presot MI, Soares RP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010; 68: 401–409.
115. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of Human DNA by Primers Targeted to *Leishmania* Kinetoplast DNA and Post-Genome Considerations in the Detection of Parasites by a Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72 (4): 423-429.

116. Silva JP. Desenvolvimento de um teste rápido para detecção de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp. [Tese de Doutorado] Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. Aprovada em 2013.
117. Novo, SPC. Levantamento da Fauna de Flebotomíneos, Vetores de Leishmanioses, na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. [Dissertação de mestrado] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 51 p. Aprovada em Abril de 2011.
118. Marinha do Brasil. [Internet]. Comando-Geral do Corpo de Fuzileiros Navais – CGCFN. Disponível em: <https://www.mar.mil.br/cgcfm/marambaia/>.
119. Souza TL Souza TL. Busca ativa de criadouros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. [Dissertação de mestrado] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 63 p. Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.
120. Novo SPC, Souza MB, Villanova CB, Meródio JC, Meira AM. Survey of sandfly vectors of leishmaniasis in Marambaia Island, municipality of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 231-3.
121. Alonso RS. Leishmaniose visceral: estudo de reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. [Dissertação de mestrado] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 88 p. Aprovada em 13 de fevereiro de 2014.
122. Carmo LAL. Monitoramento sorológico de novos casos de leishmaniose visceral canina e avaliação da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ. [Dissertação de mestrado] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 39 p. Aprovada em 26 de fevereiro de 2013.

123. Lima DA. Estudo da fauna flebotomínica em área de notificação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina, na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro. [Dissertação de mestrado] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 59 p. Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.
124. Souza TL Souza TL, Figueiredo FB, Almeida AB, Benigno CV, Pontes CS, Souza MB. Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil. *Acta Trop.* 2014 Aug; 136: 104-7.
125. Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jan-Feb 1996; 91 (1): 19-20.
126. Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, De Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol. Biol* 2002; 11 (2): 117-22.
127. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F, Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz; 2003. p. 23-51.
128. Ferreira AW, Ávila SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imune. Guanabara Koogan. 2ª ed: 443; 2001.
129. Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, Meira AM. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública.* 2003; 19: 109-118.

130. Souza MB, Carvalho RW, Machado RNM, Wermelinger ED. Flebotomíneos de áreas com notificação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2009; 53 (1): 147-150.
131. Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop*. 2010 Jan; 113 (1): 84-7.
132. Pita-Pereira D. Implementação da PCR multiplex associada à hibridização não-radioativa na detecção de DNA de *Leishmania* subgênero *Viannia* em flebótomos vetores das leishmanioses. [Dissertação de mestrado] Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ. Aprovada em 2004.
133. Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to from infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum comp*. 1990; 65 suppl 1: 37-42. Review.
134. Fu G, Perona-Wright G, Barker DC. *Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*. 1998; 90: 236-243.
135. Cabrera OL, Munsterman LE, Cardenas R, Gutierrez R, Ferro C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomédica (Bogotá)*. 2002; 22: 296-302.

APÊNDICES

- 1. Fichas de testes rápidos.**
- 2. Comparação entre testes rápidos e PCR.**
- 3. Fichas de coleta.**

1. Fichas de testes rápidos.

FICHA DE TESTE RÁPIDO ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA	
COLETA Nº 1 LOCAL DE COLETA: VACARIA	
DATA DA COLETA: 22-23/09/2014. COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr ARMADILHA CDC DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 23/09/2014 AMOSTRAS PARA TESTES: 7 POOLS DE 10 FÊMEAS = 7 TESTES	
PRIMEIRA REALIZAÇÃO DOS TESTES DURANTE A REALIZAÇÃO: TEMPERATURA: 24.3°C a 24.5°C UMIDADE: 74%	
AMOSTRA A01	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A02	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

AMOSTRA A03	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A04	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
SEGUNDA REALIZAÇÃO DOS TESTES DURANTE A REALIZAÇÃO: TEMPERATURA: 22.6°C a 22.7°C UMIDADE: 77%	
AMOSTRA A05	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A06	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A07	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

COLETA Nº 2
LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE

DATA DA COLETA: 23-24/09/2014.
COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr
ARMADILHA CDC
DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 24/09/2014
AMOSTRAS PARA TESTES: 22 *POOLS* DE 10 FÊMEAS = 22 TESTES

TERCEIRA REALIZAÇÃO DOS TESTES

DURANTE A REALIZAÇÃO:
TEMPERATURA: 24.6°C a 25.1°C
UMIDADE: 64% a 68%

AMOSTRA A08	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A09	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A10	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A11	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

QUARTA REALIZAÇÃO DOS TESTES

DURANTE A REALIZAÇÃO:

TEMPERATURA: 26.1°C

UMIDADE: 57%

AMOSTRA A12	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A13	NEGATIVO () POSITIVO (X) → FORTE () MEIO FORTE () FRACO (X)
AMOSTRA A14	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A15	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A16	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A17	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A18	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A19	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

AMOSTRA A20	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A21	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A22	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A23	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A24	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A25	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A26	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A27	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA A28	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

AMOSTRA A29	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
TOTAL DE TESTES REALIZADOS: 29 TESTES (29 POOLS DE 10 FÊMEAS, TOTALIZANDO 290 FLEBOTOMÍNEOS) RESULTADO: 28 TESTES NEGATIVOS E 1 TESTE POSITIVO FRACO.	

FICHA DE TESTE RÁPIDO ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA	
QUINTA REALIZAÇÃO DOS TESTES DURANTE A REALIZAÇÃO DOS TESTES: TEMPERATURA: 24,0°C a 25,1°C UMIDADE: 77% A 80% (manhã)	
COLETA Nº 4 LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE	
DATA DA COLETA: 27-28/10/2014. COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr ARMADILHA CDC DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 28/10/2014 AMOSTRAS PARA TESTES: 7 POOLS DE 10 FÊMEAS = 7 TESTES	
AMOSTRA B01	NEGATIVO (X) não manchou POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

AMOSTRA B02	<p>NEGATIVO (X) manchou e sumiu</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p>
AMOSTRA B03	<p>NEGATIVO (X) não manchou</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p>
AMOSTRA B04	<p>NEGATIVO () manchou e permaneceu</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p> <p>RESULTADO INCERTO</p>
AMOSTRA B05	<p>NEGATIVO () manchou e permaneceu</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p> <p>RESULTADO INCERTO</p>
AMOSTRA B06	<p>NEGATIVO (X) manchou e sumiu</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p>
AMOSTRA B07	<p>NEGATIVO (X) manchou e sumiu</p> <p>POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()</p> <p>FRACO ()</p>
<p>SEXTA REALIZAÇÃO DOS TESTES</p> <p>DURANTE A REALIZAÇÃO DOS TESTES:</p> <p>TEMPERATURA: 24,8°C A 25,1°C</p> <p>UMIDADE: 77% (tarde)</p>	

COLETA Nº 5**LOCAL DE COLETA: Praia de Caetana – Peridomicílio**

DATA DA COLETA: 28-29/10/2014.

COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr

ARMADILHA CDC

DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 29/10/2014

AMOSTRAS PARA TESTES: 1 *POOL* DE 10 FÊMEAS = 1 TESTE

AMOSTRA B08

NEGATIVO (**X**)

POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()

FRACO ()

COLETA Nº 6**LOCAL DE COLETA: Praia de São José - Galinheiro**

DATA DA COLETA: 28-29/10/2014.

COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr

ARMADILHA CDC

DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 29/10/2014

AMOSTRAS PARA TESTES: 1 *POOL* DE 10 FÊMEAS = 1 TESTE

AMOSTRA B09

NEGATIVO (**X**)

POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE ()

FRACO ()

COLETA Nº 7**LOCAL DE COLETA: Praia da Cutuca – Galinheiro**

<p>DATA DA COLETA: 28-29/10/2014. COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr ARMADILHA CDC DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 29/10/2014 AMOSTRAS PARA TESTES: 8 <i>POOLS</i> DE 10 FÊMEAS E 1 <i>POOL</i> DE 10 MACHOS PARA CONTROLE NEGATIVO (B18) = 9 TESTES</p>	
AMOSTRA B10	<p>NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()</p>
AMOSTRA B11	<p>NEGATIVO () POSITIVO (X) → FORTE () MEIO FORTE () FRACO (X)</p>
AMOSTRA B12	<p>NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()</p>
AMOSTRA B13	<p>NEGATIVO () POSITIVO (X) → FORTE () MEIO FORTE () FRACO (X)</p>
AMOSTRA B14	<p>NEGATIVO () POSITIVO (X) → FORTE () MEIO FORTE () FRACO (X)</p>
AMOSTRA B15	<p>NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()</p>

AMOSTRA B16	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA B17	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA B18	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
COLETA Nº 8 LOCAL DE COLETA: Praia Grande – Peridomicílio	
DATA DA COLETA: 28-29/10/2014. COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr ARMADILHA CDC DATA DA REALIZAÇÃO DOS TESTES: 29/10/2014 AMOSTRAS PARA TESTES: 2 <i>POOLS</i> DE 10 FÊMEAS = 2 TESTES	
AMOSTRA B19	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()
AMOSTRA B20	NEGATIVO (X) POSITIVO () → FORTE () MEIO FORTE () FRACO ()

**FÊMEAS ALIMENTADAS SEPARADAS:
2 FÊMEAS DA QUINTA COLETA E 40 DA SÉTIMA COLETA,
TOTALIZANDO 42 FÊMEAS**

**TOTAL DE TESTES REALIZADOS: 20 TESTES
(19 *POOLS* DE 10 FÊMEAS, TOTALIZANDO 190 FÊMEAS E 1 *POOL* DE 10 MACHOS,
TOTALIZANDO 200 FLEBOTOMÍNEOS)
42 FÊMEAS ALIMENTADAS SEPARADAS
RESTANTE DIRECIONADO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES EM LABORATÓRIO**

2. Comparação entre testes rápidos e PCR.

COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE RÁPIDO E DA PCR			
COLETA Nº 1 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: VACARIA			
AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (PRIMEIRA REALIZAÇÃO)	PCR	AVALIAÇÃO (VERDADEIRO POSITIVO/ VERDADEIRO NEGATIVO/ FALSO POSITIVO/ FALSO NEGATIVO)
AMOSTRA A01	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A02	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A03	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A04	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (SEGUNDA REALIZAÇÃO)	PCR	AVALIAÇÃO
AMOSTRA A05	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO

AMOSTRA A06	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A07	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
COLETA Nº 2 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: PERIDOMICÍLIO			
AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (TERCEIRA REALIZAÇÃO)	PCR	AVALIAÇÃO
AMOSTRA A08	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A09	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A10	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A11	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (QUARTA REALIZAÇÃO)	PCR	AVALIAÇÃO
AMOSTRA A12	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A13	POSITIVO FRACO	POSITIVO	VERDADEIRO POSITIVO
AMOSTRA A14	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO

AMOSTRA A15	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A16	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A17	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A18	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A19	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A20	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A21	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A22	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A23	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A24	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA A25	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A26	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A27	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A28	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA A29	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO

TOTAL: 29 POOLS DE 10 FÊMEAS, TOTALIZANDO 290 FLEBOTOMÍNEOS.

RESULTADO DOS TESTES RÁPIDOS: 28 NEGATIVOS E 1 POSITIVO FRACO (AMOSTRA A13).

RESULTADO DA PCR: 7 POSITIVOS (A13, A17, A18, A19, A22, A23 e A24).

**AVALIAÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS: 22 VERDADEIROS NEGATIVOS; 1 VERDADEIRO
POSITIVO (A13);
6 FALSOS NEGATIVOS.**

TAXA MÍNIMA DE INFECÇÃO NA PRAIA GRANDE: 3,1; TAXA MÍNIMA DE INFECÇÃO: 2,4.

COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE RÁPIDO E DA PCR

COLETA Nº 4
ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA
LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE

AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (QUINTA REALIZAÇÃO)	PCR	AVALIAÇÃO (VERDADEIRO POSITIVO/ VERDADEIRO NEGATIVO/ FALSO POSITIVO/ FALSO NEGATIVO)
AMOSTRA B01	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA B02	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA B03	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B04	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B05	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA B06	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA B07	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO

COLETA Nº 5 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: PRAIA DE CAETANA			
AMOSTRA	TESTE RÁPIDO (SEXTA REALIZAÇÃO)	PCR	AValiação
AMOSTRA B08	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
COLETA Nº 6 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: PRAIA DE SÃO JOSÉ			
AMOSTRA B09	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
COLETA Nº 7 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: PRAIA DA CUTUCA			
AMOSTRA B10	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B11	POSITIVO FRACO	NEGATIVO	FALSO POSITIVO
AMOSTRA B12	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B13	POSITIVO FRACO	POSITIVO	VERDADEIRO POSITIVO
AMOSTRA B14	POSITIVO FRACO	NEGATIVO	FALSO POSITIVO

AMOSTRA B15	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B16	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B17	NEGATIVO	POSITIVO	FALSO NEGATIVO
AMOSTRA B18	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
COLETA Nº 8 ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE			
AMOSTRA B19	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
AMOSTRA B20	NEGATIVO	NEGATIVO	VERDADEIRO NEGATIVO
TOTAL: 19 POOLS DE 10 FÊMEAS E 1 POOL DE 10 MACHOS, TOTALIZANDO 200 FLEBOTOMÍNEOS. * 42 FÊMEAS ALIMENTADAS SEPARADAS RESULTADO DOS TESTES RÁPIDOS: 17 NEGATIVOS E 3 POSITIVOS FRACOS (AMOSTRA B11, B13 E B14). RESULTADO DA PCR: 7 POSITIVOS (B01, B02, B05, B06, B09, B13 E B17). AVALIAÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS: 1 VERDADEIRO POSITIVO (B13), 2 FALSOS POSITIVOS (AMOSTRA B11 E B14), 11 VERDADEIRO-NEGATIVOS, 6 FALSOS NEGATIVOS (B01, B02, B05, B06, B09 E B17).			

3. Fichas de coleta.

FICHA DE COLETA ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA			
COLETA Nº 1 LOCAL DE COLETA: VACARIA			
<p>DATA DA COLETA: 22-23/09/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>ARMADILHA CDC</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 7 POOLS DE 10 FÊMEAS = 7 TESTES)</p>		<p style="text-align: center;">DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (21/09/2014): 11,4 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,2 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 15,5°C e 20,3°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 2,4 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: última noite de lua minguante.</p>	
<p>TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 92 (82 FÊMEAS E 10 MACHOS).</p>			
ESPÉCIES COLETADAS/SEXO			
	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	12	8	20
<i>Migoneimyia migonei</i>	-	1	1
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	1	1
Fêmeas não identificadas	70	-	70
Total	82	10	92

COLETA Nº 2

LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE

<p>DATA DA COLETA: 23-24/09/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 22 POOLS DE 10 FÊMEAS = 22 TESTES)</p>	<p style="text-align: center;">DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (22/09/2014): 0,0 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 16,8°C e 22,4°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 5,6 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: Lua: primeira noite de lua nova.</p>
---	---

TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 680 (429 FÊMEAS E 251 MACHOS)

ESPÉCIES COLETADAS/SEXO

	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	121	46	167
<i>Migoneimyia migonei</i>	66	194	260
<i>Micropygomyia. capixaba</i>	08	-	08
<i>Pintomyia fischeri</i>	12	08	20
<i>Brumptomyia sp.</i>	-	03	03
<i>Evandromyia Edwardsi</i>	02	-	02
Fêmeas não identificadas	220	-	220
Total	429	251	680

COLETA Nº 3
LOCAL DE COLETA: VACARIA

DATA DA COLETA: 23-24/09/2014

COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr

NÚMERO DE ARMADILHAS: 3

(AMOSTRAS PARA TESTE: 0)

DADOS CLIMÁTICOS/COLETA

PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (22/09/2014): 0,0 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.

TEMPERATURA - durante a coleta: entre 16,8°C e 22,4°C.

UMIDADE - durante a coleta: 100%.

VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 5,6 m/s.

FASE LUNAR: Lua: primeira noite de lua nova.

TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 258 (106 FÊMEAS E 152 MACHOS)

ESPÉCIES COLETADAS/SEXO

	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	97	147	244
<i>Migoneimyia migonei</i>	07	04	11
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	01	01
<i>Micropygomyia. capixaba</i>	01	-	01
<i>Evandromyia Edwardsi</i>	01	-	01
Total	106	152	258

TOTAL DE FLEBOTOMINEOS COLETADOS NO PRIMEIRO MÊS: 1.030

TOTAL DE FEMEAS COLETADAS: 617

TOTAL DE MACHOS COLETADOS: 413

TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS IDENTIFICADOS: 740

290 FÊMEAS DIRECIONADAS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS E NÃO IDENTIFICADAS

FICHA DE COLETA
ÁREA: ILHA DE MARAMBAIA

COLETA N° 4
LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE

<p>DATA DA COLETA: 27-28/10/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>ARMADILHA CDC</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 07 POOLS DE 10 FÊMEAS = 07 TESTES)</p>	<p style="text-align: center;">DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (26/10/2014): 13,4 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 13,6 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 17,3°C e 21,9°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 99 a 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 4,1 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: quinta noite de lua nova.</p>
--	--

TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 125 (84 FÊMEAS E 41 MACHOS).

ESPÉCIES COLETADAS/SEXO

	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	03	10	13
<i>Migoneimyia migonei</i>	07	30	37
<i>Brumptomyia</i> sp.	01	01	02
<i>Evandromyia Edwardsi</i>	03	-	03
Não identificados	70	-	70
Total	84	41	125

COLETA Nº 5

LOCAL DE COLETA: PRAIA DE CAETANA

<p>DATA DA COLETA: 28-29/10/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 01 POOL DE 10 FÊMEAS = 01 TESTE)</p>		<p>DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (27/10/2014): 0,2 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 17,7°C e 21,6°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 3,3 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: sexta noite de lua nova.</p>	
<p>TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 34 (17 FÊMEAS E 17 MACHOS)</p>			
<p>ESPÉCIES COLETADAS/SEXO</p>			
	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	02	11	13
<i>Migoneimyia migonei</i>	03	06	09
Não identificados	12	-	12
Total	17	17	34

COLETA Nº 6

LOCAL DE COLETA: PRAIA DE SÃO JOSÉ

<p>DATA DA COLETA: 28-29/10/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 01 POOL DE 10 FÊMEAS = 01 TESTE)</p>		<p>DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (27/10/2014): 0,2 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 17,7°C e 21,6°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 3,3 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: sexta noite de lua nova.</p>	
<p>TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 25 (13 FÊMEAS E 12 MACHOS)</p>			
<p>ESPÉCIES COLETADAS/SEXO</p>			
	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	02	03	05
<i>Migoneimyia migonei</i>	01	09	10
Não identificados	10	-	10
Total	13	12	25

COLETA Nº 7

LOCAL DE COLETA: PRAIA DA CUTUCA

<p>DATA DA COLETA: 28-29/10/2014</p> <p>COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr</p> <p>NÚMERO DE ARMADILHAS: 2</p> <p>(AMOSTRAS PARA TESTE: 08 POOLS DE 10 FÊMEAS E 01 POOL DE 10 MACHOS (CONTROLE NEGATIVO)= 09 TESTES)</p>		<p>DADOS CLIMÁTICOS/COLETA</p> <p>PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (27/10/2014): 0,2 milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.</p> <p>TEMPERATURA - durante a coleta: entre 17,7°C e 21,6°C.</p> <p>UMIDADE - durante a coleta: 100%.</p> <p>VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 3,3 m/s.</p> <p>FASE LUNAR: sexta noite de lua nova.</p>	
<p>TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 237 (143 FÊMEAS E 94 MACHOS)</p>			
<p>ESPÉCIES COLETADAS/SEXO</p>			
	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	15	17	32
<i>Migoneimyia migonei</i>	03	66	69
<i>Pintomyia fischeri</i>	03	-	03
<i>Micropygomyia. capixaba</i>	01	-	01
<i>Evandromyia Edwardsi</i>	01	01	02
Não identificados	120	10	130
Total	143	94	237

COLETA Nº 8**LOCAL DE COLETA: PRAIA GRANDE**

DATA DA COLETA: 28-29/10/2014

COLETA 12 HORAS: 19:00-07:00hr

NÚMERO DE ARMADILHAS: 2

(AMOSTRAS PARA TESTE: 02 *POOLS* DE 10
FÊMEAS= 02 TESTES)**DADOS CLIMÁTICOS/COLETA**PRECIPITAÇÃO - Dia anterior à coleta (27/10/2014): 0,2
milímetros; 24 horas anteriores à coleta: 0,0 milímetros.

TEMPERATURA - durante a coleta: entre 17,7°C e 21,6°C.

UMIDADE - durante a coleta: 100%.

VELOCIDADE DO VENTO – entre 0,0 e 3,3 m/s.

FASE LUNAR: sexta noite de lua nova.

TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS: 54 (30 FÊMEAS E 24 MACHOS)**ESPÉCIES COLETADAS/SEXO**

	Fêmeas	Machos	Total
<i>Nyssomia Intermedia</i>	04	03	07
<i>Migoneimyia migonei</i>	06	21	27
Não identificados	20	-	20
Total	30	24	54

TOTAL DE FLEBOTOMINEOS COLETADOS NO SEGUNDO MÊS: 475**TOTAL DE FEMEAS COLETADAS: 287****TOTAL DE MACHOS COLETADOS: 188****TOTAL DE FLEBOTOMÍNEOS IDENTIFICADOS: 233****190 FÊMEAS E 10 MACHOS (CONTROLE NEGATIVO) DIRECIONADOS PARA REALIZAÇÃO DOS
TESTES RÁPIDOS E NÃO IDENTIFICADOS**