

“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”

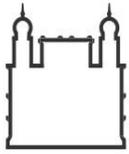
por

Denise Alves de Lima

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

*Orientador principal: Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Segundo orientador: Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza*

Rio de Janeiro, fevereiro de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Estudo e avaliação da fauna flebotomínica em área de notificação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina, na Ilha da Marambaia, Mangaratiba”

apresentada por

Denise Alves de Lima

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Sandro Antonio Pereira

Prof. Dr. Antonio Nascimento Duarte

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo – Orientador principal

Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor incondicional,
pelo olhar carinhoso e compreensivo nos meus momentos
de cansaço e pela força de suas orações
e
ao meu fiel e insubstituível Dr. Frederico, sempre presente
mesmo de longe, participando de tudo o tempo todo
e nunca me deixou nem ao menos pensar em desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Frederico Antonio Porto Rodrigues, por ter sido mais do que um amigo, mas principalmente um companheiro fiel, presente em todos os momentos e com certeza, acreditou em mim muito mais do que eu mesma. Hoje posso dizer que ele está nas entrelinhas de cada frase deste trabalho. A minha vitória é sua também!

Aos meus pais Levy Alves de Lima e Dulce Maria Gomes de Lima, pelos olhares carinhosos que supriam minha carência a cada reencontro. Que mesmo na distância se fizeram presentes nos meus momentos mais difíceis. Pai e mãe, esse título é nosso!!!

Ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo, mais do que um orientador, um grande amigo, que entendeu todas as minhas limitações e me ajudou a superar todas elas. Um exemplo de homem inteligente, humilde e de caráter inigualável, e que hoje é a minha maior referência em leishmaniose.

Ao Dr. Marcos de Souza Barbosa, meu coorientador, que acompanhou todo o meu crescimento e me ensinou a falar de flebotomíneos de uma maneira que nunca pensei que eu fosse ser capaz. Tinha que ser você pra dividir este momento tão importante em minha vida. Muito obrigada, Dr. Marcos!

Ao Dr. Raimundo Wilson de Carvalho, que acreditou no meu potencial e me ensinou os primeiros passos dentro da área científica. Muito obrigada por tudo que me ensinou e principalmente por ter me dado uma segunda chance. O resultado está aqui.

Ao Dr. Antonio Nascimento Duarte, então chefe do Departamento de Ciências Biológicas, por ter me recebido com carinho e amizade desde o meu primeiro momento na Fundação Oswaldo Cruz. Dr. Duarte, você é o “camarada mais gente fina” do mundo!

As médicas veterinárias Ma. Monique Campos e Dr^a Denise Amaro que foram importantíssimas na realização deste trabalho com seus ensinamentos sobre reação da polimerase em cadeia (PCR). Sempre presentes em todos os meus momentos de dúvida e na terrível sensação de não saber nada. Muito obrigada por tudo, meninas!!!

Aos técnicos do Laboratório de Endemias Rurais, Sidney Alves, César Pontes, Cleidil Nunes, Wallace Osório, Luis Carlos Pinna, Flávio Alcelino, Elir Dias, a quem hoje chamo carinhosamente de família, que além do profissionalismo indiscutível,

foram fiéis companheiros no trabalho de identificação de flebótomos. Tudo que sei hoje devo a paciência e amizade de todos vocês. Muito obrigada por tudo!!

Aos meus grandes amigos de campo Adilson Almeida e a médica veterinária Ma. Livia Lopes, por todas as vezes que entenderam minha ausência e se propuseram a caminhar em meu lugar por horas sob sol ou chuva na Ilha da Marambaia estudando meus pontos de captura.

A querida Dr^a Fernanda Nunes Santos pelo força, amizade e alegria quando de minha aprovação no processo seletivo. Comemoramos juntas! Ficamos felizes juntas! Obrigada por tudo, “Fê”!

A minha mega amiga, Dr^a. Shênia Patricia, que mesmo não estando sempre por perto, é uma das grandes responsáveis pela realização deste trabalho. Amiga, nem preciso te dizer o quanto você é especial pra mim... Obrigada por tudo, principalmente por ter sido companheira quando precisei, por ter acreditado no meu potencial e por ter vindo correndo a cada grito de socorro meu...Você vale mais do que ouro. Você vale um título de Dr^a. em Ciências. Te amo!

Aos meus grandes amigos do Departamento de Ciências Biológicas Emilson Domingos, Nilton Francisco, Silvio Montenegro, Roberto Ney e Ciro Villanova, por terem sido grandes amigos e por terem estado sempre ao meu lado quando o cansaço e o desânimo tentavam me abater.

À equipe mais linda, feminina e acolhedora da Fiocruz, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, onde fui muito bem recebida e encontrei não só uma equipe disciplinada, mas também grandes amigas.

A toda equipe do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, onde conheci pessoas maravilhosas, que levarei pra sempre em meu coração: Heloísa, Marcia (esterilização), Rogéria (secretaria), Elizangela(recepção)... Sempre prontas a nos ajudar, nem que fosse apenas com um sorriso ou um abraço caloroso de bom dia.

Ao meu grande amigo Dr. Fabricio Saavedra, que me ensinou a ver a vida com outros olhos e principalmente a nunca desistir mesmo quando tudo parece estar perdido. Você acreditou, meu amigo! E você tinha razão... Eu consegui.

As minhas amigas lindas Dr^a. Deise Coelho e Dr^a Lilia Calazans, porque deram cor e muito mais alegria na disciplina de Epidemiologia e conseguiram com que eu saísse inteira apesar do trauma. Sem vocês não teria sido a mesma coisa. Amo vocês!

Aqueles que compartilharam comigo toda a emoção do mestrado, desde o resultado do processo seletivo, até hoje, a ansiedade da defesa, meus amigos Maira Látea, Hugo Costa, Thais Leal, Ricardo França, Jefferson Pereira e Carolina Morse. O melhor de tudo isso foi ter conhecido vocês. Ficarão na memória e no coração para sempre.

A todos os meus professores da subárea Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis, em especial as professoras da disciplina Seminários Avançados por todas as broncas e carinhosos puxões de orelha em cada apresentação que fazíamos: Rosemere Duarte, Joseli Nogueira e Sheila Mendonça, muito obrigada por tudo!!!

A todos os meus amigos, professores, coordenadores e principalmente meus alunos da Instituição de Ensino Senac Rio, que compreenderam minhas ausências, minha falta de tempo, meu cansaço...Sei que em alguns momentos não pude ser a melhor, mas saibam que dei sempre o melhor de mim pra vocês. Obrigada a todos vocês pela força!

A CAPES pelo apoio financeiro durante esses dois anos de trabalho.

A Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca que mudou a minha vida e hoje faz parte da minha história.

A minha família, minha base, minha vida, meu tudo... Mais um título para comemorar ao lado de vocês.

E, finalmente, ao meu amado DEUS, por ter me dado de presente todas essas pessoas queridas que contribuíram, cada uma a sua maneira, para a realização deste trabalho. Sabemos que na vida, não fazemos nada sozinho. Precisamos de olhares de apoio, palavras de incentivo e atitudes de amor e confiança. A Ti, meu Deus, entrego tudo que faço e o que conquisto, e digo sempre: que seja feita a TUA vontade.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência
em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e
vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

Resumo

O principal vetor da leishmaniose visceral americana no Brasil é a espécie *Lutzomyia longipalpis*, embora outras espécies também tenham sido incriminadas como possíveis vetoras. Na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro, estão sendo diagnosticados casos de leishmaniose visceral canina, o que gera grande preocupação, devido a falta de conhecimento sobre os fatores epidemiológicos envolvendo esses casos. Por esse motivo, o presente estudo tem como objetivo ampliar o estudo da fauna flebotomínica dessa região e avaliar através da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) a detecção de DNA de *Leishmania infantum* nos organismos capturadas. O inquérito entomológico foi realizado utilizando armadilhas luminosas de sucção (modelo CDC) no período de julho de 2012 a julho de 2013. Os espécimes coletados foram encaminhados para o Laboratório Instituto de Endemias Rurais – Ensp/ Fiocruz, para identificação das espécies. Após a identificação, as amostras foram separadas em pools por espécie e sexo e encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz para serem analisadas pela técnica de PCR convencional e em tempo real. O levantamento entomológico realizado nesta região apontou *Nyssomyia intermedia* como a espécie mais abundante, seguida por *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* e *Pintomyia fischeri*. Através dos resultados obtidos pela PCR convencional, 4 pools de *N. intermedia* apresentaram produtos de amplificação para *Leishmania sp.* Com a utilização da técnica da PCR em tempo real, 3 pools de *N. intermedia* e 1 pool de *M. migonei* apresentaram amplificação para material genético de *Leishmania infantum*. A detecção de DNA de *Leishmania infantum* em *N. intermedia*, associada à baixa densidade de *L. longipalpis*, reforça a ideia de que uma nova espécie possa atuar como vetora da LVC na região estudada. Embora este resultado não confirme a sua participação no ciclo de transmissão da LV, o presente estudo abre uma nova perspectiva para o conhecimento epidemiológico e de controle desta zoonose.

Palavras-chaves: leishmaniose, flebotomíneos, levantamento entomológico, reação da polimerase em cadeia

Abstract

The main vector of American visceral leishmaniasis in Brazil is *Lutzomyia longipalpis* species, although other species also have already been incriminated as possible transmitters. In Marambaia Island, city of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro, are reported cases of canine visceral leishmaniasis, which causes great concern due to lack of knowledge on the epidemiological factors involving this outbreak. Therefore, this study aims to extend the study of sand fly fauna of this region and assess using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *Leishmania infantum* DNA in the species caught. The entomological survey was conducted using suction light traps (CDC model). The specimens were sent to the Laboratory Institute of Rural Endemic Diseases - Fiocruz, for species identification. After identification, the samples were separated into pools by species and sex and sent to the Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatose em Animais Domésticos do Instituto Evandro Chagas - Fiocruz to be analyzed by PCR conventional and real time. The entomological survey in this region pointed *Nyssomyia intermedia* as the most abundant species, followed by *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* and *Pintomyia fischeri*. According to conventional PCR, four pools *N. intermedia* showed amplification products *Leishmania sp.* Using the technique of real time PCR, three pools *N. intermedia* and 1 pool of *M. migonei* showed amplification for genetic material from *Leishmania infantum*. Detection of DNA of *Leishmania infantum* in *N. intermedia* associated with a low density of *L. longipalpis*, reinforces the idea that a new species may be acting as the vector of LVC in the region studied. Although this result does not confirm their participation in the VL transmission cycle, this study opens a new perspective for epidemiological and control of VL.

Key words: leishmaniasis, sand fly, entomological survey, polymerase chain reaction

Lista de Abreviaturas

LV – leishmaniose visceral

LVA – leishmaniose visceral americana

LVC – leishmaniose visceral canina

LTA – leishmaniose tegumentar americana

PCR – reação da polimerase em cadeia

DNA – ácido desoxirribonucleico

CDC – Centers for Disease Control

RNAse A- ribonuclease A

mL – mililitros

µl – microlitros

PBS – phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)

°C – graus Celsius

g – grama

s – segundos

mg- miligramas

rpm- rotação por minuto

pb- pares de bases

MgCl₂. cloreto de magnésio

Tris-HCL- tris hidrocloreto

dNTPs- desoxirribonucleotídeos fosfatados

Taq- *Thermus aquaticus*

Lista de Figuras

Figura 1 – Mapa de distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil.....	9
Figura 2 - Ilha da Marambaia com pontos marcados onde foram realizadas as capturas.....	17
Figura 3 – Armadilha luminosa CDC em ambiente intradomiciliar.....	18
Figura 4 – Armadilha luminosa CDC em ambiente peridomiciliar (galinheiro).....	18
Figura 5 – Armadilha luminosa CDC em região de mata.....	19
Figura 6 – Fêmea de <i>Nyssomyia intermedia</i>	20
Figura 7 – Espermateca – principal estrutura de identificação das fêmeas encontrada no sétimo segmento abdominal.....	20
Figura 8 - Reação em Cadeia da Polimerase convencional: produto de amplificação para o gênero <i>Leishmania sp</i>	27
Figura 9 – Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real: amplificação para a espécie <i>Leishmania infantum</i>	28

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Total das espécies de flebotomíneos capturadas no período de julho de 2012 a julho de 2013. Percentual de machos e fêmeas sobre o total de cada espécie.....25
- Tabela 2** – Relação das espécies capturadas em regiões de peri e intradomicílio e região de mata.....26
- Tabela 3** – Relação de espécies capturadas em pontos distintos da Ilha da Marambaia (regiões de praia).....26
- Tabela 4** – Relação das espécies separadas em pools, analisadas pela PCR convencional e em tempo real.....28

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Leishmaniose Visceral Americana.....	7
1.2. Leishmaniose Canina e Humana.....	10
1.3. Vetor.....	11
1.4. Reação da Polimerase em Cadeia.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Desenho de Estudo e População Alvo.....	16
4.2. Área de Estudo.....	16
4.3. Avaliação da Fauna Flebotomínica.....	17
4.3.1. Captura.....	19
4.3.2. Identificação e Processamento dos Flebótomos para PCR.....	19
4.3.3. Extração de DNA dos Flebótomos.....	20
4.3.4. Avaliação do DNA Extraído.....	21
4.3.5. PCR Convencional.....	21
4.3.4. PCR em Tempo Real (qPCR).....	22
4.3.4.1. Realização da Curva Padrão.....	22
4.3.4.2. Amplificação de DNA.....	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
9. ANEXO.....	46

1. Introdução

1.1. Leishmaniose Visceral Americana

Leishmanioses são grupos de doenças enzoóticas e zoonóticas causadas por um parasita protozoário do gênero *Leishmania* Ross 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) mostrando variedades de graus de especificidade por hospedeiro ¹. A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos ². Cães atuam como um importante reservatório doméstico para o agente etiológico, *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* Shaw, 2002. A importância do reservatório canino deriva do restrito e frequente contato entre cães e humanos, e o fato de que estes animais podem apresentar infecção sem a presença de sinais clínicos, apesar do alto grau de parasitismo na pele saudável e vísceras ³.

Existe uma grande polêmica em torno da origem da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo- se ela foi introduzida na época da colonização europeia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone. Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas ⁴.

Os mamíferos silvestres hospedeiros da *L. infantum* conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus*, Lund 1842, no Ceará ⁵; e *Cerdocyus thous*, Linnaeus 1766, no Pará ⁶ e em Minas Gerais ⁷. *L. infantum* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis*, Linnaeus 1758, na Bahia ⁸ e no Rio de Janeiro ⁹.

A primeira descrição da LV foi na Grécia, em 1835 onde anteriormente era conhecida como “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Em 1869 foi denominada na Índia “Kala-jwar” (febre-negra) ou Kala-azar (Calazar) em virtude do escurecimento da pele observado durante a doença ¹⁰.

William Boog Leishman no ano de 1900, em Bengal na Índia, identificou a presença de um protozoário no baço de um soldado que foi a óbito em decorrência de uma febre conhecida como “Dum Dum”. Em 1903, o agente etiológico foi descrito por Donovan que demonstrou a presença dos parasitos em aspirados esplênicos de uma criança

que apresentava febre irregular. Rogers, em 1904, foi o primeiro a cultivar o parasita em sangue citratado a 22°C e observou que nas culturas o parasita se apresentava na forma flagelada. Nicolle e colaboradores encontraram parasitos em cães no ano de 1908, na Tunisia, sugerindo papel destes animais como reservatórios. Apenas no ano de 1931 é que os flebotomíneos foram incriminados como vetores, onde a transmissão do agente etiológico ficou conhecida através de xenodiagnóstico em hamsters ¹¹.

A LV tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, neste último continente também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical ¹². Nas Américas, a LV ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, Nicarágua, México, El Salvador e Brasil ¹³.

Dos 500.000 novos casos anuais em humanos no mundo, estima-se que 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão com estimativas de mais de 50.000 mortes. O número crescente dos casos está relacionado principalmente ao deslocamento das populações, exposição da população não imunizada, fatores econômicos e sociais, má nutrição e co-infecção de pessoas com HIV ¹⁴.

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso a partir de um material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso ¹⁵. A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania sp.*, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste ¹⁶. A seguir, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, Lutz e Neiva 1912, foi incriminado como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães.

Desde então, casos de leishmaniose visceral (LV) vêm sendo descritos em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. A LV tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão do agente etiológico, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente, no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone ¹⁷.

No estado do Rio de Janeiro, a LV foi registrada pela primeira vez em 1978, no município do Rio de Janeiro ¹⁸. A doença foi detectada nos arredores periurbanos de Bangu. O caso índice foi um homem de 55 anos de idade cujo desfecho foi o óbito ¹⁹.

Em 1983 foram notificados 35 casos autóctones em áreas peri-urbanas da cidade do Rio de Janeiro, situadas nas vertentes continentais norte (bairro de Realengo e Bangu), noroeste (Senador Camará), oeste (Campo Grande) e sudeste do Maciço da Pedra Branca ¹⁸. O estado do RJ é assinalado como área de transmissão esporádica de LV, entretanto, esta doença vem se dispersando para diferentes áreas do município do Rio de Janeiro ²⁰, Angra dos Reis (caso canino e humano 2002), Mangaratiba (1984 e 2001) e Itaguaí (2006) (dados não publicados) ²¹. O mapa a seguir mostra o atual quadro epidemiológico da LV no Brasil.

Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil

Mapa de estratificação de LV, segundo município de residência e média de casos, de 2009 a 2011

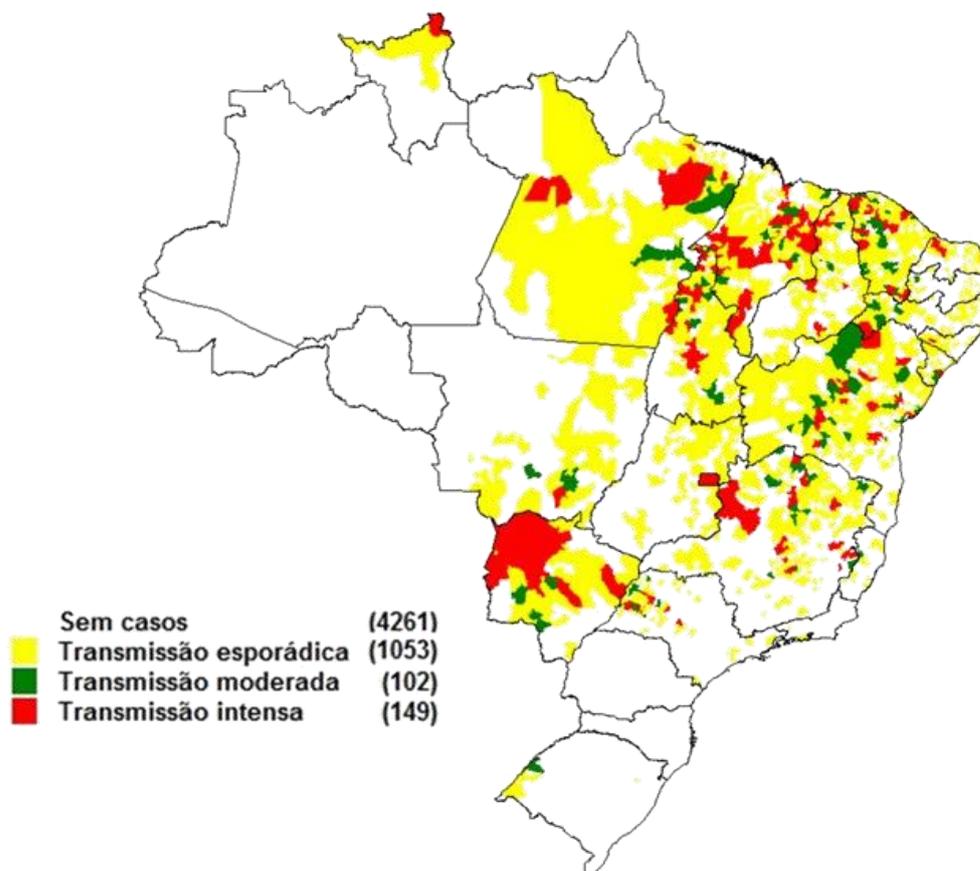


Figura 1- Mapa de distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil

Fonte: www.portal.saude.gov.br

1.2. Leishmaniose Canina e Humana

No Brasil, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. A crescente urbanização da doença ocorrida nos últimos 20 anos coloca em pauta a discussão das estratégias de controle empregadas⁴.

A LVA clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Em alguns focos urbanos existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens²².

Nos casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita através de métodos parasitológicos²².

O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras doenças presentes nas áreas onde incide a LVA, como por exemplo, doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose. Pacientes com LVA apresentam febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia⁴.

O diagnóstico clínico da LV canina é muitas vezes um problema para o veterinário. Há um amplo espectro de sinais clínicos inespecíficos, animais infectados podem se apresentar aparentemente saudáveis, com poucos sinais clínicos e com estágio avançado da doença. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Nos cães, a doença é sistêmica crônica e pode levar o animal à morte. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados que não apresentam sinais clínicos, são fontes de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão da *Leishmania sp.*²³. Estudos dos fatores de risco para a LV canina no Brasil até o momento não evidenciaram predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção⁴.

De modo geral, o quadro clínico se assemelha a doença humana, com febre irregular de longo curso, palidez de mucosas e um emagrecimento progressivo, até o estado de caquexia intensa, na fase terminal. A hipertrofia do sistema fagocitário mononuclear (SFM), levando a esplenomegalia, hepatomegalia e adenopatia generalizada, é bastante frequente, porém pouco referida. No entanto, os sinais mais evidentes estão

relacionados às alterações cutâneas e de fâneros: perda de pelos, que é bastante frequente podendo ser focal ou generalizada; pequenas ulcerações crostosas, isoladas ou confluentes, observadas no focinho, orelhas e extremidades; descamação ou dermite furfurácea, que acompanham a depilação; alongamento das unhas (grifose); opacificação da córnea (queratite intersticial), após conjuntivite purulenta; além de outros sinais como apatia, diarreia, hemorragia intestinal, paresia do trem posterior, edema e vômitos ¹⁹.

1.3. Vetor

Os flebotomíneos das Américas são usualmente distribuídos em três gêneros: *Brumptomyia*, França e Parrot 1921, com cerca de 25 espécies conhecidas, em geral associadas a tatus; *Waryleya*, Hertig 1940, com sete espécies; e *Lutzomyia*, França 1924, com cerca de 430 espécies. Somente o gênero *Lutzomyia* inclui espécies de importância médica. Este gênero é dividido em vários subgêneros e grupos de espécies, com sistemática muito complexa e controvertida. No mundo, das aproximadamente 700 espécies conhecidas, cerca de 70 já foram incriminadas como vetores ou consideradas como suspeitas na transmissão da *Leishmania sp.* ²⁴.

Os flebotomíneos são popularmente conhecidos no Brasil como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira, frebóti etc. São mais comuns em áreas florestais ou próximo destas, mas podem invadir domicílios e anexos em grande quantidade ²⁴. Os flebotomíneos ocorrem em todos os estados brasileiros ²⁵.

Segundo Aguiar e Medeiros, 2003²⁶ os flebotomíneos, assim como a generalidade dos dípteros, são insetos holometabólicos. As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os adultos são amarelados, muito pequenos, com cerca de 2,5 mm de comprimentos. As pernas são longas e delgadas, possuem vôos saltitantes e quando em repouso mantêm as asas eretas, que são hialinas e densamente revestidas de cerdas longas.

Iniciam suas atividades no crepúsculo vespertino. Quanto à alimentação, ambos os sexos sugam sucos vegetais ou soluções açucaradas. As fêmeas também são hematófagas, exceto raríssimas espécies autógenas, pois necessitam de sangue animal ou humano para a maturação de seus ovos ²⁶.

Souza e colaboradores²⁰ descreveram *Lutzomyia longipalpis*, como principal vetor da LV no Brasil, sendo apontado em seguida por evidências epidemiológicas, como vetor desta protozoose no município do Rio de Janeiro. Esta espécie já havia sido coletada no município de Mangaratiba e Angra dos Reis, anteriormente a ocorrência dos primeiros casos humanos e caninos de LV^{27 28 29}.

Lutzomyia longipalpis é a mais importante espécie vetora da leishmaniose visceral nas Américas, e é certamente a única espécie de flebotomíneo (incluindo as associadas com a transmissão do agente etiológico de leishmaniose tegumentar) que preenche todos os critérios estabelecidos para uma competência vetorial³⁰, destacando aqueles que são considerados essenciais, como antropofilia, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da doença e infecção natural por *L. infantum*^{5 31 32}.

Em 1973, registros no Sudeste e Nordeste do Brasil mostraram a presença de *L. longipalpis* dentro de habitações humanas e anexos, com animais domésticos e rurais incluindo jumentos³³.

Este flebotomíneo colonizou gradualmente o ambiente rural, e na década de 1980 começou a invadir o ambiente urbano, especialmente a periferia das grandes cidades, onde foi capturado em ambiente intra e peridomiciliar³².

Esta mesma espécie tem ampla distribuição geográfica abrangendo as Américas Central e do Sul. As formas imaturas deste flebotomíneo parecem desenvolver-se preferentemente em ecótopos situados sob ou entre rochas. Os escassos criadouros naturais foram encontrados nessas condições. Isso não impede que o díptero possa adaptar-se e criar-se em outros biótopos, entre os quais podem incluir-se alguns de origem artificial. É o que foi assinalado no Nordeste brasileiro, onde a criação do flebotomíneo foi observado em currais de jumentos³⁴.

Vale ressaltar que no estado do Mato Grosso do Sul, a LV também pode ser transmitida por *Lutzomyia cruzi* Mangabeira, 1938, e, em Pernambuco, *Migonemyia migonei* França, 1920 está sendo considerado possível vetor^{35 36 37}.

A determinação das taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania sp.* constitui uma importante ferramenta para os estudos epidemiológicos das leishmanioses e de competência vetorial³⁸. A técnica da dissecação do trato digestivo do vetor e a pesquisa direta do parasitismo eram empregadas com esta finalidade; entretanto, atualmente vem sendo substituída pela reação da polimerase em cadeia (PCR), que consiste na amplificação do DNA do parasito, exibindo elevada especificidade e sensibilidade³⁹.

1.4. Reação em Cadeia da Polimerase

Nos últimos 10 anos, métodos moleculares têm sido desenvolvidos e usados para a identificação de *Leishmania sp.*, ou isoladas de culturas de pacientes⁴⁰ bem como a detecção do parasita em “pools” de espécies de flebotomíneos⁴¹. A principal vantagem destes métodos são suas sensibilidades e especificidades, independente do número, estágio e localização da *Leishmania sp.* no trato digestivo do vetor⁴². Nos últimos anos, métodos moleculares tem sido aplicado em estudos de competência vetorial de flebotomíneos, mesmo em áreas com baixas taxas de infecção⁴³.

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica molecular utilizada para amplificar um único ou algumas cópias de um fragmento de DNA através de várias ordens de magnitude, gerando milhares de cópias de uma sequência de DNA particular. Foi desenvolvida em 1984 pelo bioquímico americano, Kary Mullins⁴⁴.

Segundo Rodgers et. al. 1990⁴⁵, esta técnica, tem sido extensivamente usada em diagnósticos das doenças humanas e estudos epidemiológicos devido a sua alta sensibilidade.

A PCR também tem sido usada para o diagnóstico da LV com ótima exatidão. Também pode ser empregada com precisão significativa para prever a cura da doença⁴⁶. Teoricamente, a presença de um parasita por flebotomíneo seria suficiente para ser detectada pela PCR⁴⁷.

A técnica PCR em tempo real (qPCR) é uma categoria de PCR convencional que permite a detecção e quantificação em tempo real de uma região específica de um determinado material genético. Este sistema está substituindo a PCR convencional no diagnóstico e acompanhamento de muitas doenças, sendo capaz de realizar medições muito sensíveis e precisas de DNA presentes em uma amostra^{48 49}.

Soares et. al. 2010³⁸ demonstraram em seu estudo que a técnica de PCR foi capaz de detectar a infecção natural por *L. infantum* em populações de *L. longipalpis*, independentemente da existência de casos ativos de LV, revelando-se assim, como um instrumento de grande importância para a saúde pública.

2. Justificativa

As leishmanioses estão entre as doenças infecciosas-parasitárias de maior incidência no mundo ⁵⁰. Essas parasitoses envolvem protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotomíneos, que têm como reservatórios mamíferos domésticos e silvestres ⁵¹. Fatalidade em casos não tratados é alta ¹⁸.

A região da Ilha da Marambaia, na cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro vem apresentando casos de leishmaniose visceral canina desde outubro de 2009 (casos notificados segundo informações do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz).

Esta localidade também é ocupada por uma comunidade quilombola (remanescente dos quilombos – descendentes de escravos). Um levantamento realizado pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (Incra) no ano de 2006 estimou a existência de aproximadamente 262 famílias quilombolas na região ⁵² além de ser frequentada anualmente por centenas de militares oriundos de diferentes regiões endêmicas de leishmaniose no Brasil⁵³.

Em estudo realizado por Novo, 2011⁵³, observa-se a diversidade da fauna flebotomínica da região. Este fato pode estar associado à dificuldade de controle da doença na região, pois ainda se desconhece as espécies envolvidas no ciclo de transmissão da zoonose.

É fundamental para o entendimento da cadeia de transmissão e controle da doença, a determinação das espécies de flebotomíneos vetores e o monitoramento da taxa de infecção de populações, sobretudo, em ambientes antrópicos. Por este motivo, justifica-se este estudo, o qual busca reavaliar a fauna flebotomínica da região e detectar, através da técnica da PCR convencional e PCR em tempo real, material genético de *Leishmania sp.* e *Leishmania infantum*, respectivamente, nas espécies de flebotomíneos capturadas.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a fauna flebotomínica da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro no período de julho de 2012 a julho de 2013.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Caracterizar as espécies e densidade populacional da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia;
- Detectar, através da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) convencional e em tempo real, material genético de *Leishmania sp.* e *Leishmania infantum*, respectivamente, nas espécies de flebotomíneos capturadas na região.

4. Metodologia

4.1. Desenhos do estudo e população alvo

Trata-se de um estudo seccional que foi realizado no período de julho de 2012 a julho de 2013 na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro, no qual a população alvo foram os flebotomíneos da região capturados dentro do mesmo período.

4.2. Área de estudo

A Ilha da Marambaia faz parte do conjunto que, incluindo a Restinga da Marambaia, se estende por 42,5km e situa-se no litoral Sul Fluminense. Favorecida pela posição geográfica e pelo acesso limitado, conserva ainda representativa parcela das florestas que compõem a Mata Atlântica, podendo ser observados vários tipos de ecossistemas: a Serra do Mar, a Restinga e Ilha da Marambaia, a Ilha Grande, manguezais e diversas outras ilhas, além do delta do rio Guandu, que formam uma grande baixada situada entre os municípios de Itaguaí e do Rio de Janeiro⁵⁴.

A Ilha da Marambaia (23° 04' 51" S – 44° 00' 39" W e 23° 03' 48 S – 43° 33' 96" W (figura 2)) é uma reserva ecológica que apresenta relevo e vegetação bastante distintos, com áreas de praia, restinga, matas de encosta, além de mangues. Sua porção oeste liga-se ao continente, a leste, na região de Guaratiba, por uma faixa estreita de areia com cerca de 40 km de extensão formada durante o Holoceno, a Restinga da Marambaia⁵³.

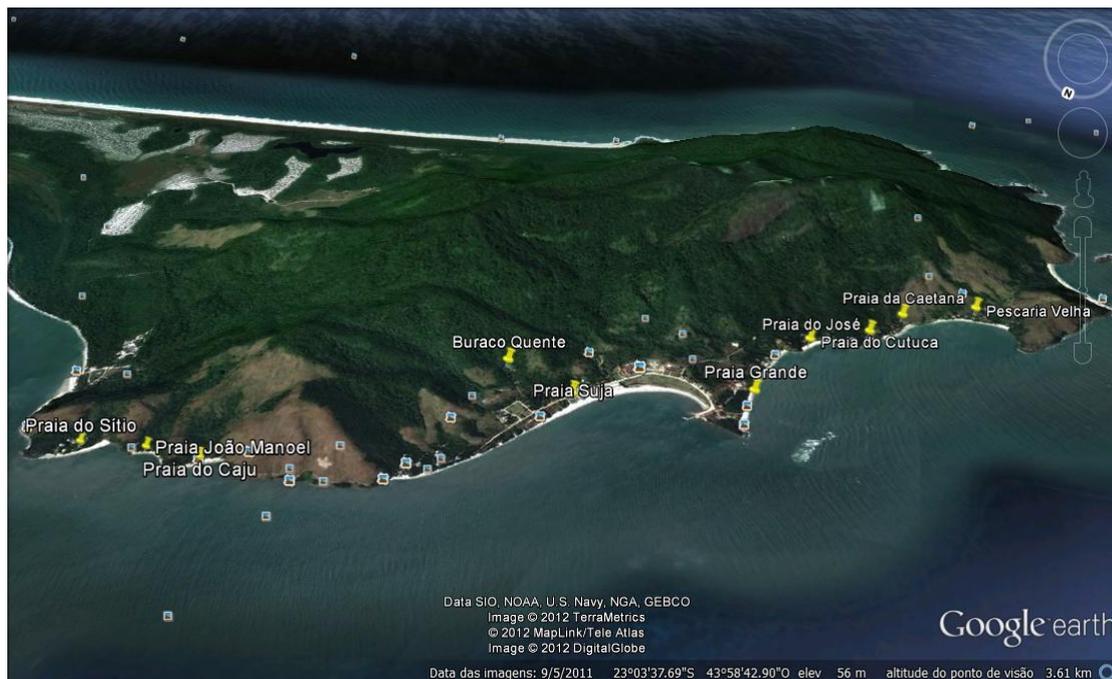


Figura 2: Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro



Pontos onde foram realizadas as capturas dos flebotomíneos

4.3. Avaliação da fauna flebotomínica

4.3.1 Captura

Para a captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas de sucção (modelo CDC), as quais foram introduzidas em ambiente intradomiciliar (figura 3) peridomiciliar, (galinheiros e canis) (figura 4) e ambiente silvestre (figura 5), em regiões distintas da Ilha da Marambaia: Praia do Sítio, Praia João Manoel, Praia do Caju, Buraco Quente, Praia Suja, Praia Grande, Praia do José, Praia do Cutuca, Praia da Caetana e Praia da Pescaria Velha (figura 2). As armadilhas foram colocadas às 18h e retiradas às 7h da manhã seguinte, durante uma semana, uma vez por mês, durante um ano, um total de 13h de coletas por armadilha. Os espécimes coletados foram acondicionados em tubos do tipo Falcon contendo álcool 70% devidamente identificados, indicando a data, a localidade, e encaminhados ao Laboratório Instituto de Endemias Rurais, Ensp/Fiocruz para a identificação do processo de triagem.



Figura 3: Armadilha modelo CDC colocada em ambiente intradomiciliar, na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro, no período de julho de 2012 a julho de 2013.
Foto: Denise Alves de Lima



Figura 4: Armadilha modelo CDC colocada em ambiente peridomiciliar (galinheiro), na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro no período de julho de 2012 a julho de 2013.
Foto: Denise Alves de Lima



Figura 5: Armadilha modelo CDC colocada em ambiente silvestre nas proximidades das residências, na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro no período de julho de 2012 a julho de 2013.

Foto: Denise Alves de Lima

4.3.2 Identificação e Processamento dos Flebótomos para realização da PCR e qPCR

Os espécimes de flebótomos capturados foram separados manualmente com o auxílio de uma lupa. Após, foram colocados em placas de Petri pequenas e novamente com auxílio da lupa foi dado o início do processo de identificação. Foram separadas primeiramente em machos e fêmeas. Para a identificação das fêmeas, foi preciso realizar a abertura do flebótomo pelo sétimo segmento abdominal, onde se encontra a espermateca (figura 7), que é a principal estrutura de identificação das fêmeas. Este segmento, que é a porção final do abdome, foi retirado do flebotomíneo, fixado na lâmina com lamínula e levada ao microscópio para a identificação. O restante da parte abdominal foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf com álcool 70% e encaminhado para o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonose em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC) na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para extração do DNA e realização da técnica da PCR. Os machos também

foram identificados e encaminhados ao Lapclin-Dermzoo/ IPEC para serem utilizados como controles negativos. Os espécimes foram identificados conforme Galati, 2003⁵⁵.



Figura 6: Identificação de uma fêmea da espécie *N. intermedia*.

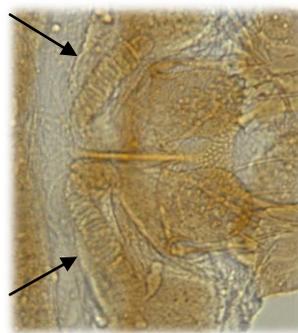


Figura 7: As setas apontam a espermateca— principal estrutura de identificação das fêmeas de flebotomíneos.

4.3.2. Extração de DNA dos flebotomíneos

Para a extração de DNA foi utilizado o “kit” Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini spin kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações contidas no mesmo. Dez flebotomos foram transferidos para um tubo tipo eppendorf contendo 1mL de PBS e submetido a centrifugação (16.000 x g por 2 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentado nas amostras mais 50µL de PBS. As amostras foram maceradas manualmente com auxílio de um pistilo.

Após a maceração, 50µL de solução de lise e 10µL de solução proteinase K foram adicionadas e homogeneizadas durante 15 segundos, sendo em seguida, incubadas em banho-seco (56°C) durante 1 hora. Após, centrifugada a 2000 x g por 10 segundos foi adicionado 5µL de RNase A (20mg/mL), sendo as amostras incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 500µL de solução lise, homogeneizando durante 15 segundos, permanecendo em repouso, em temperatura ambiente, por 10 minutos. Ao final, as amostras foram transferidas, através de uma mini coluna, para outro tubo fornecido pelo kit (tubos de coletas) e submetida a centrifugação (13.000 x g por 1 minuto). Após, o sobrenadante foi descartado, adicionado 500µL de solução lise e novamente centrifugado (13.000 x g por 1 minuto). Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao “pellet” 500µL de tampão de lavagem (“wash buffer”), homogeneizado repetido a centrifugação, adicionado 50µL de tampão de eluição

(“Elution Buffer”), aguardado 1 minuto e centrifugado (11.000 x g por 1 minuto). Foram identificados com a data e código da extração e estocado abaixo de -10°C .

4.3.3. Avaliação do DNA extraído

A técnica de avaliação do DNA extraído permite a quantificação de DNA utilizando corantes fluorescentes, que são detectados pela plataforma. Foi utilizado a plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) e o “kit” Qubit® dsDNA HS “kit” de ensaio seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação, foram feitas as curvas utilizando os padrões do kit. Foi feita a solução de trabalho adicionando em um tubo Eppendorf, 199 μL de tampão Qubit e 1 μL de reagente Qubit para cada amostra e em seguida foi homogeneizado. Para preparar os padrões para a curva – padrão 1 e padrão 2 foi adicionado 190 μL da solução de trabalho e 10 μL do padrão 1 e 2 respectivamente, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 2 minutos. Para a quantificação das amostras foi adicionado 199 μL da solução de trabalho e 1 μL da amostra a ser quantificada. Após a quantificação das amostras, os valores foram salvos e anotados.

4.3.4. PCR Convencional

Todas as amostras foram submetidas a um protocolo padronizado no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do IPEC/Fiocruz, onde o mesmo é utilizado para amplificação de DNA de *Leishmania sp.*

A amplificação foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeos: 5' - (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC - 3' e 5' - GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA que amplificam um fragmento de 120pb que corresponde a uma região conservada no minicirculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania* ⁵⁶.

A reação foi realizada em volume final de 25,0 μL , contendo tampão Tris-HCL (10 mM), MgCl_2 (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), Taq DNA Polimerase (2,5 U), DNA da amostra (5 μL) e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação iniciaram-se a 94°C por 15

minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos, realizado em termociclador automático (PTC-100 Pelthier Thermal Cycler MJ Research, GMI Inc., Minesota, EUA). Como controle positivo para cada reação foram utilizados 5 ng/μL da cepa referência de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75), e dois controles negativos (todos os componentes da reação exceto o DNA para *Leishmania infantum*).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 2%, impregnado por “gelred”, submetidos a uma corrida de 80V por aproximadamente 2 horas. Foi utilizado o marcador de tamanho de DNA de 100bp (pares de base) na concentração de 1μg/μL, aplicado em um “slot” do gel de agarose. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho de sistema digital L-PIX HE (Loccus Biotecnologia[®], São Paulo, Brasil).

4.3.4. PCR em tempo real (qPCR)

4.3.4.1 Realização da Curva Padrão

As culturas foram extraídas utilizando o “kit” DNeasy[®] Blood & Tissue (Quiagen[®]) seguindo as recomendação do fabricante. Foi centrifugado um “pellet” de 1×10^6 de cultura e *L. infantum* por cinco minutos a 190 x g, ressuspensão em 200 μL de PBS e adicionado 20 μL de proteinase K, em seguida adicionado 200 μL do tampão AL e homogeneizado, adicionado 200 μL de etanol (100%) e novamente homogeneizado. Em seguida o mini tubo coluna foi identificado e transferido o lisado cuidadosamente para cada tubo sem atingir a borda, centrifugado a 8000 x g por um minuto, colocado o mini tubo coluna em outro tubo de coleta (2mL) limpo e descartado o tubo de coleta contendo o derramado, adicionado 500μL de solução AW1 e centrifugado a 8.000 x g por 1 minuto, colocado o mini tubo coluna em um tubo de coleta (2mL) e descartado o derramado, adicionado 500μL de solução AW2, centrifugado a 14.000 x g por 3 minutos, colocado o mini tubo coluna em um tubo Eppendorf (1,5-2mL) e descartado o tubo de coleta contendo o derramado, adicionado 200 μL de tampão AE no centro da membrana, incubado por 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugado a 8.000 x g por 1 minuto, foi transferido o que sobrou para os tubos identificados e estocado abaixo de -20°C. No momento de construir a placa, o extraído foi diluído numa proporção de 1:10.

A curva-padrão relaciona-se às concentrações de DNA padrão, quantidades conhecidas de DNA, que o *software* efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste.

A curva padrão foi estabelecida com amostras de cultura de *L. infantum* variando de 1×10^5 a 0,1 *Leishmania*.

4.3.4.2 - Amplificação de DNA

Após a extração, as amostras foram amplificadas utilizando sistema TaqMan® na plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®). Cada amostra foi realizada em duplicata.

A sonda TaqMan® MGB e o PCR foram desenhados para visar as regiões conservadas do KDNA do DNA de *L. infantum*. Os primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTG-GTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTT TCCCGCC-3') e a sonda TaqMan- MGB (FAM- 5'AAAAATGGGTGCAGAAAT- 3'- NFQ -MGB) utilizadas foram descritos anteriormente no protocolo de Francino et al. 2006⁴⁸.

As amostras foram amplificadas na plataforma StepOne™ (The Applied Biosystems®).

O volume final da reação foi de 25 µL, 5 µL de amostras e 20 µL de mix contendo 12,5 µL de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1,5 µL dos primers LEISH-1 E LEISH-2 a 900 nM e 2,5 µL da sonda a 200 nM.

O protocolo dos ciclos foi: 1 ciclo de 50° C por 2 minutos, 1 ciclo de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 40 ciclos de 60° C por 1 minuto. Em cada amplificação foram usados controles positivos e negativos e o ciclo limiar foi determinado para cada amostra pela determinação do ponto em que a fluorescência emitida ultrapassou o limite considerado negativo. Para o teste de inibição, foi repetida toda a técnica da qPCR, adicionando 5µl de 10^6 DNA de *Leishmania infantum* em cada amostra com resultado negativo.

5. Resultados

Durante doze meses de trabalho realizado na Ilha da Marambaia, foram capturados 1622 flebotomíneos, das quais 684 (42,1%) são fêmeas e 938 (57,8%) são machos.

As coletas ocorreram entre os meses de julho de 2012 a julho de 2013, sendo uma vez na estação chuvosa/ quente e outra na estiagem/ fria e em três sítios de coletas: região peri e intradomiciliar e região de mata. Manobras militares, períodos de fortes chuvas, problemas relacionados a transportes e hospedagem implicaram em coletas irregulares.

A espécie *N. intermedia*, apareceu em maior densidade, com 1017 exemplares capturados, o que representa 62,7% das amostras total, sendo 507 machos (49.8%) e 510 fêmeas (50.2%), seguida por *M. migonei*, com 543 exemplares, representando 33,4% das amostras, sendo 383 machos (70.5%) e 160 fêmeas (29.4%) e por *L. longipalpis*, que apareceu em menor número quando comparada as demais espécies, com apenas 40 exemplares capturados representando apenas 2.4% das amostras, sendo 34 machos (85%) e 6 fêmeas (15%). A espécie *P. fischeri* teve apenas três exemplares capturados.

Dentre as espécies coletadas, apenas *N. intermedia*, *L. longipalpis*, *M. migonei* e *P. fischeri* apresentam relevância epidemiológica na transmissão das leishmanioses. Além dessas espécies, também foram capturadas *Brumptomyia sp.*(03 fêmeas), *Evandromyia edwardsi* (03 fêmeas), *Micropygomyia schireiberi* (09 machos e 03 fêmeas), *Micropygomyia capixaba* (1 fêmea), as quais, segundo estudos, ainda não apresentaram relevância no ciclo de transmissão das leishmanioses (Tabela 1).

Tabela 1: Relação de espécies capturadas na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba no período de julho de 2012 a julho de 2013

Espécie	Machos	%	Fêmeas	%	Total	%
<i>Nyssomyia intermedia</i>	507	49.8	510	50.1	1017	62.7
<i>Migonemyia migonei</i>	383	70.5	160	29.4	543	33.4
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	34	85	6	15	40	2.4
<i>Pintomyia fischeri</i>	2	66.6	1	33.3	3	0.18
<i>Micropygomyia capixaba</i>			1	100	1	0.0
<i>Micropygomyia schireiberi</i>	9	75	3	25	12	0.7
<i>Evandromyia edwardsi</i>			3	100	3	0.1
<i>Brumptomyia sp.</i>	3	100			3	0.1
Total	938		684		1622	99.6

Em relação aos sítios de captura, houve um predomínio da espécie *N. intermedia* em região de peridomicílio (galinheiro), embora esta espécie também tenha sido capturada em todos os outros pontos de captura. O mesmo observa-se com a espécie *M. migonei*, a qual obteve um predomínio na ambiente peridomiciliar, porém também foi capturada em todos os outros pontos. As espécies *L. longipalpis*, e *P. fischeri*, embora capturadas em baixa densidade, também predominaram em ambiente peridomiciliar (Tabela 2).

Tabela 2: Relação das espécies capturadas em regiões de peri e intradomicílio e região de mata, na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, no período de julho de 2012 a julho de 2013

Espécie	Peri		Intra		Mata	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>Nyssomyia intermedia</i>	477	465	0	11	33	31
<i>Migonemyia migonei</i>	114	234	08	34	38	115
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	5	21		13	1	
<i>Pintomyia fischeri</i>	1	1	0	1	0	0
<i>Micropygomyia capixaba</i>	1					
<i>Micropygomyia schireiberi</i>	3	4	0	0	0	5
<i>Evandromyia edwardsi</i>	3					
<i>Brumptomyia sp.</i>						3
Total	604	725	08	59	58	154

Nas áreas de praia da Ilha da Marambaia, a espécie *N. intermedia* foi abundante em todos os ecótopos (Tabela 3).

Tabela 3: Total de espécies capturadas nas regiões de praia da Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba no período de julho de 2012 e julho de 2013.

Espécies	PV	Caetana	Cutuca	José	Roberto	Hotel	Sítio	Suja
<i>N. intermedia</i>	740	5	60	85	48	23	30	26
<i>M. migonei</i>	106	6	135	94	1	0	201	1
<i>L. longipalpis</i>	26	12	2	0	0	0	0	0
<i>P. fischeri</i>	0	0	0	3	0	0	0	0
<i>M. capixaba</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>M. schireiberi</i>	0	0	3	4	0	0	5	0
<i>E. edwardsi</i>	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Brumptomyia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	3	0
Total	872	23	197	187	49	23	231	27

Praias: Pescaria Velha, Praia da Caetana, Praia do Cutuca, Praia do José, Praia do Roberto, Praia do Hotel, Praia do Sítio, Praia Suja

Somente as fêmeas de *N. intermedia*, *M. Migonei* e *L. longipalpis* foram analisadas pelas técnicas PCR. Somando um total de 674 fêmeas, os “pools”, contendo

10 amostras cada um, foram agrupados da seguinte maneira: 51 pools de *L. intermedia*, 16 de *L. migonei* e 1 de *L. longipalpis* com apenas 6 exemplares.

Quatro “pools” de *N. intermedia* (15, 17, 18 e 21) apresentaram produtos de amplificação para o gênero *Leishmania* sp. através da análise da técnica PCR convencional (figura 8). O “pool” contendo *L. longipalpis* não apresentou produto de amplificação. As amostras tiveram suas reações de PCR e eletroforese repetidas para confirmação do resultado. Em seguida, as amostras foram submetidas à técnica da PCR em tempo real (qPCR) (figura 9). Três “pools” de *N. intermedia* (33, 15 e 17) e um de *M. migonei* (55) apresentaram produtos de amplificação para a espécie *Leishmania infantum* através da técnica qPCR. As demais espécies não foram analisadas devido ao baixo número de amostras capturadas conforme mostra tabela 1. De acordo com o teste de inibição realizado nas amostras negativadas, 11 “pools” contendo a espécie *N. intermedia* (05, 06, 07, 23, 24, 26, 28, 30, 32, 35, 37) e três contendo a espécie *M. migonei* (61, 62, 63) não apresentaram amplificação para DNA de *Leishmania infantum*.

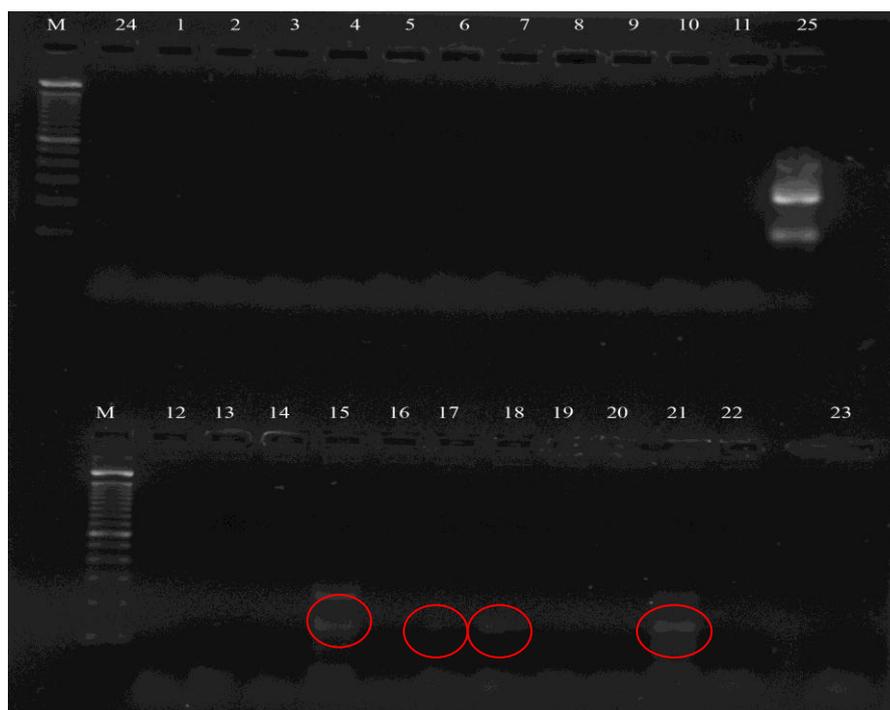


Figura 8: PCR convencional: Produtos de amplificação para o gênero *Leishmania* sp. realizada em fêmeas de flebotomíneos. Amostras 15, 17, 18 e 21 positivas para *Leishmania* sp.; 24. Controle negativo, 25. Controle positivo, M. Marcador de peso molecular.

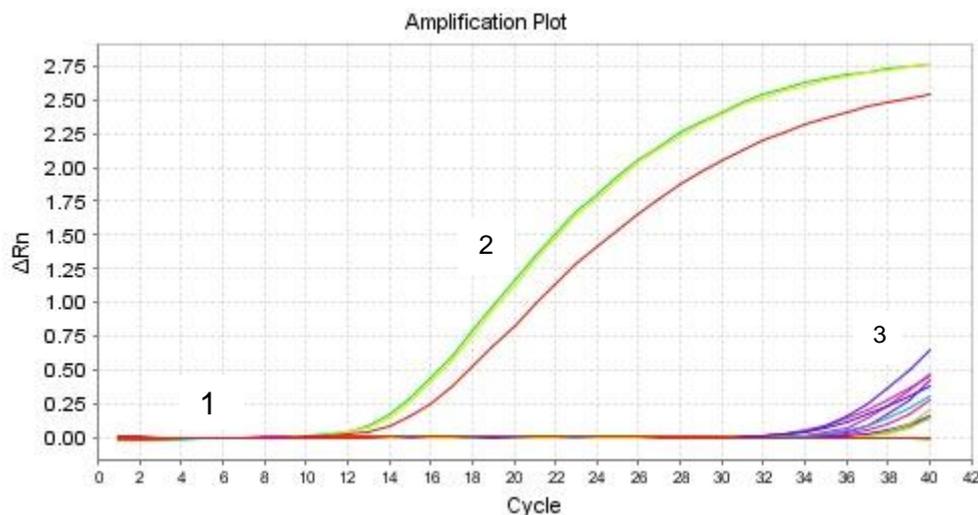


Figura 9: PCR tempo real: Curva de amplificação para a espécie *Leishmania infantum*; C_T - Cycle Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas no processo: (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) amplificação da curva padrão (controle positivo) realizada em triplicata: a quantidade de produtos da PCR aumenta a cada ciclo e (3) amplificação das amostras: cada cor representa uma amostra. Considera-se resultados positivo, a amostra que sofreu amplificação até o C_t 36

Tabela 3: Detecção de DNA de *Leishmania* sp. e *Leishmania infantum* em espécies de flebotomíneos capturadas na Ilha da Marambaia, no período de julho de 2012 a julho de 2013

Espécie	Fêmeas	Pools	PCR*	qPCR**
<i>N. intermedia</i>	510	51	4	3
<i>M. migonei</i>	160	16	-	1
<i>L. longipalpis</i>	6	1	-	-

* Pools positivos para *Leishmania* sp.

** Pools positivos para *Leishmania infantum*

5. Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram a grande ocorrência de *N. intermedia*, na Ilha da Marambaia, região endêmica da LVC. Como em grandes áreas endêmicas de leishmanioses no município do Rio de Janeiro, esta espécie predominou nos ambientes trabalhados, corroborando sua grande valência ecológica em ambientes alterados^{57 58 59}. Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com os obtidos por Novo et al. 2011⁵³ na mesma região, onde há o registro da prevalência de *N. intermedia* sobre *L. longipalpis*. *N. intermedia* foi coletado em todas as localizações e em todos os ecótopos estudados, mostrando seu alto nível de importância na fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia. Esta espécie é de grande importância epidemiológica na transmissão da leishmaniose tegumentar no Brasil, porém neste estudo, os resultados demonstram que esta espécie aparece em abundância nas regiões onde estão sendo notificados casos de LVC.

Nyssomyia intermedia tem uma distribuição conhecida desde o estado do Piauí até o do Rio Grande do Sul e do litoral do Brasil ao norte da Argentina e sul da Bolívia, ocorrendo em áreas de clima e altitude bastante diversificados. A faixa de latitudes da distribuição geográfica de *N. intermedia*, conhecida atualmente é um pouco maior que a citada por Martins e Morales Farias, 1972⁶⁰, já que vai de 5°05'21"S (Teresina) a 31°06'25"S (Mostarda, RS), enquanto a referida por estes autores ia de cerca de 9° S a cerca de 27° S.

No presente estudo, um resultado semelhante foi observado para a espécie *M. migonei*, considerado por muitos investigadores como um vetor secundário da LTA no Brasil. Este resultado corrobora com estudos de Carvalho et al. 2010³⁷, onde esta espécie foi capturada em abundância em ambiente peridomiciliar com armadilha CDC. Nesse mesmo estudo, esta espécie foi encontrada naturalmente infectada pela *Leishmania infantum*, sendo apontada, portanto, como principal vetora da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. Segundo pesquisadores, os critérios defendidos para uma boa competência vetorial de *M. migonei* estão de acordo com Killick Kendrick, 1990³⁰ e Lainson & Rangel, 2005³², associados à ausência da principal espécie incriminada como vetora da LV, *L. longipalpis*.

No presente estudo a espécie *Pintomyia fischeri* teve sua maior densidade em ambiente peridomiciliar. De acordo com Pita Pereira, 2011⁶¹, esta espécie tem sido registrada em estados brasileiros do Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Região Sul.

Segundo estudos realizados por Aguiar e Medeiros, 2003⁶² e Rangel e Lainson, 2009⁶³, esta espécie era considerada essencialmente silvestre, porém tem se adaptado a ambientes peridomésticos desde 1953, tendo sido registrado nas proximidades de habitações de animais domésticos concordando com os achados deste estudo. Lainson, 1983⁶⁴, considerando a abundância desta espécie em áreas de leishmaniose tegumentar, sugere sua transmissão de *Leishmania braziliensis* entre animais silvestres em áreas florestadas. Recentemente, *P. fischeri* foi encontrada naturalmente infectada pela *L. braziliensis* em flebotomíneos coletados no estado do Espírito Santo, mas os autores necessitam de mais evidências epidemiológicas para incriminar este flebotomíneo como vetor local da leishmaniose tegumentar⁶⁵. Existem alguns registros de *P. fischeri* apresentando comportamento antropofílico. Entretanto há algumas discussões relativas as suas preferências quanto a alimentar-se de cães, aves, ou terem hábitos ecléticos^{66 67}.

Embora as coletas não tenham obedecido a uma rotina mensal de capturas, a principal espécie incriminada como vetora da leishmaniose visceral, *L. longipalpis* foi capturada em densidade relativamente baixa, quando comparada as demais espécies de importância epidemiológica encontradas. Esta espécie, até o momento, é incriminada como principal vetora da LV no Brasil⁴ e, no Estado do Rio de Janeiro esta afirmativa é baseada em evidências epidemiológicas^{3 20 21}.

Soares et al. 2006 e Penha et al. 2006^{68 69} descreveram em estudos realizados na Ilha de São Luis no Maranhão que esta espécie foi encontrada em alta densidade em todos os meses do ano, e que adapta-se facilmente em ambientes humanos. No Estado do Pará, esta espécie era inicialmente silvestre, e aos poucos foi se adaptando a habitações humanas localizadas em áreas impactadas^{70 71 72}. Estes dados confirmam os achados deste estudo, no qual *L. longipalpis* apareceu em maior densidade em ambiente peri e intradomiciliar, porém sendo capturado apenas nos meses de agosto e outubro.

De acordo com estudos de Marzochi et al. 2009¹⁸, no momento de primeiro registro de caso autóctone de leishmaniose visceral no Rio de Janeiro, a fauna flebotomínica predominante no bairro de Bangu era *L. longipalpis* (97,9%) em altitudes acima de 100m, enquanto *N. intermedia* predominou abaixo de 100m. Entretanto, em pesquisa realizada por Souza et.al. 2003²⁰ na Barra da Tijuca, Jacarepagua e Guaratiba, onde também ocorriam casos de leishmaniose visceral no mesmo ano, *N. intermedia* era a espécie predominante de flebotomíneo, enquanto *L. longipalpis* foi o menos frequente. Estes resultados, assim como os achados deste estudo, sugerem a participação de *N.*

intermedia no ciclo de transmissão da LVC, visto que esta espécie segue todos os critérios de competência vetorial citados por Killick-Kendrick, 1988⁷³.

Galati et. al. 1997⁷⁴ e Souza et. al. 2000⁷⁵ também observaram a ausência de *L. longipalpis* em diferentes áreas com ocorrência de casos humanos autóctones de LV.

A baixa de densidade ou mesmo a ausência de *L. longipalpis* talvez possa explicar a ausência de casos humanos na área estudada. Segundo Souza et al. 2003²⁰, 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 flebótomo no ciclo de transmissão com hábitos alimentares direcionados para os cães e outros animais domésticos

Esta hipótese pode ser reforçada através de pesquisas que utilizam ferramentas moleculares, para detectar infecção natural ou DNA de *Leishmania sp.* em flebotomíneos.

A técnica da PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de doenças em seres humanos e animais, devido à sua alta sensibilidade e especificidade^{45 76}. Além do diagnóstico em hospedeiros, a PCR também pode ser utilizada na detecção de agentes infecciosos em vetores. Segundo De Bruijn & Barker, 1992⁴⁷ a presença de um único parasita de *Leishmania sp.* em flebotomíneo seria suficiente para sua detecção pela técnica de PCR.

Para a pesquisa de DNA de *Leishmania sp.* em flebotomíneos neste estudo, foram aplicadas duas técnicas de PCR, a convencional e em tempo real. Em ambas as técnicas foi possível detectar material genético do parasito, entretanto, a PCR em tempo real foi capaz identificar *Leishmania infantum*, sem a necessidade da utilização de sequenciamento ou outros procedimentos e em um período de tempo reduzido. Isso foi possível pela utilização do sistema TaqMan® que é baseado no uso de iniciadores e a sonda de hidrólise desenhados especificamente para região interna da sequência, o que impede a formação de produtos inespecíficos, e com isso, conferindo alta especificidade a técnica⁷⁷.

A espécie *L. longipalpis* foi encontrada naturalmente infectada no estado de Minas Gerais por Michalski et al. 2011⁷⁸ e no Estado do Maranhão por Soares et al. 2010³⁸. Entretanto, no “pool” analisado neste estudo, não foi amplificado DNA de *Leishmania* nessa espécie. Essa negatividade pode ser justificada pela utilização de um único “pool”, aliado ao baixo número de exemplares capturados para a presente pesquisa.

A espécie *M. migonei* apresentou produto de amplificação para DNA de *Leishmania infantum* através da técnica da PCR em tempo real. Este resultado corrobora com os estudos realizados por Carvalho et al. 2010³⁷, no Estado de Pernambuco, onde esta espécie foi encontrada naturalmente infectada e atualmente vem sendo incriminada como principal vetora da LV neste estado. Segundo os autores, a baixa densidade da espécie *L. longipalpis* aliado a detecção de DNA de *Leishmania* em *M. migonei* justificam essa suspeita.

Além do estudo realizado em Pernambuco, Missawa et al. 2011⁷⁹ confirmaram a participação da *L. cruzi* como vetora da LV no Estado de Mato Grosso.

O resultado mais importante do presente estudo foi o encontro de três “pools” de *N. intermedia* com produtos amplificados de *Leishmania infantum* pela PCR em tempo real. Este resultado fortalece a possibilidade de uma nova espécie de flebotomíneo atuar como vetora em áreas endêmicas de LV. Esse achado pode seguir os mesmos critérios defendidos para participação da *M. migonei* no ciclo de transmissão da LV, entre os quais, a baixa densidade de *L. longipalpis* ou a não notificação de sua presença e a alta densidade de *N. intermedia*, distribuídos em regiões da Ilha da Marambaia onde estão sendo notificados casos de LVC.

É importante lembrar que para a confirmação dessa hipótese serão necessários que estudos relacionados a competência vetorial como antropofilia, distribuição espacial de acordo com a área de transmissão e número de casos, incidência de casos humanos e infecção natural por *L. infantum*^{5 31 32} sejam realizados.

Em outros dois pools de *N. intermedia* foi possível a amplificação pela PCR convencional. Esse resultado sugere que nesses dois casos o material genético seja de *L. braziliensis*, visto que *N. intermedia* é a principal vetora incriminada na transmissão da LT no estado do Rio de Janeiro^{65 80 75}. Esses “pools” não foram amplificados pelo qPCR específico de *L. infantum*.

De acordo com o teste de inibição, 11 “pools” de *N. intermedia* e três de *M. migonei* não apresentaram produtos de amplificação. Este fato pode ser explicado devido a presença de inibidores do PCR na identificação do parasito dentro do vetor. De acordo com Paiva et al. 2007³⁹ e Higgins & Azard, 1995⁸⁰ os insetos possuem em seus tecidos inibidores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR, majoritariamente em exoesqueleto, cabeça e tórax. Neitzke et al. 2008⁵¹ justificou a ocorrência da inibição em seu estudo pela presença de substâncias presentes no conteúdo digestório destes insetos capazes de diminuir a sensibilidade da PCR. De acordo com Paiva et al. 2007³⁹, a

mínima quantidade de DNA perdido durante o processo de extração em insetos pode gerar resultados negativos. O uso de fenol/cloforofórmio/álcool isoamílico para o processo de lavagem das amostras também podem afetar a atividade enzimática da reação do DNA polimerase, segundo Aransay et al. 2000⁸¹. Neste estudo, foi utilizado o kit padronizado pelo IPEC para o processo de lavagem de amostras, entretanto, para o processo de maceração do inseto foi utilizado todo o tecido abdominal do inseto incluindo conteúdo digestório, o que pode justificar a ocorrência da inibição.

Em decorrência do resultado obtido pelo teste de inibição, concluímos que poderíamos ter obtido um número positivo de amostras ainda maiores.

O uso da PCR convencional e em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania sp.* em flebotomíneos apresenta muitas vantagens, entre as quais a possibilidade de identificação precisa do parasita no inseto vetor com iniciadores específicos, revelando-se como um instrumento de grande importância em saúde pública.

A detecção de DNA de *Leishmania infantum* em *N. intermedia*, e sua alta densidade em regiões de notificação de LVC, associada à baixa densidade de *L. longipalpis* e ausência de casos humanos na região, reforça a ideia de que uma nova espécie possa estar atuando como vetora da LVC na região estudada. Embora este resultado não confirme a sua participação no ciclo de transmissão da LVC, o presente estudo abre uma nova perspectiva para o conhecimento epidemiológico e de controle da LV.

6. Conclusões

- A fauna flebotomínica da Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro apresenta grande diversidade de espécies.
- *Nyssomyia intermedia* e *M. migonei* apareceram em grande abundância quando comparadas a espécie *L. longipalpis*.
- As técnicas da PCR convencional e qPCR foram capazes de detectar material genético de *Leishmania* sp. e *Leishmania infantum* respectivamente, em flebotomíneos, revelando-se ferramentas de grande importância para estudos epidemiológicos e saúde pública.
- Embora a presença de material genético de *Leishmania infantum* na espécie *N. intermedia* não confirme sua participação no ciclo de transmissão da LVC, não podemos negligenciar o potencial vetorial desta espécie.

7. Referências Bibliográficas

1. Chance ML. The biochemical and immunological taxonomy of *Leishmania*. Em: Chang, K.P. & Bray, R.S. Leishmaniasis. Amsterdam, Elsevier, 1985; p. 93-110.
2. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, De Paiva Hoffmann M, De Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1998; 12: 315-317.
3. Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza MA, de Toledo LM, de Filho FBR. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. Caderno de Saúde Pública, RJ, 1985; p. 432-446.
4. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia São Paulo, 2004; v. 7, n. 3, p.338-349, 2004.
5. Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1956.
6. Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA. Amazonian Visceral Leishmaniasis-Distribution of the Vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in Relation to the Fox *Cerdocyon thous* (Linneaus) and the efficiency of this Reservoir Host as a Source of Infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1990; 85:135-137.
7. Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral Visceral Leishmaniasis in a Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in South-East Brazil. Veterinary Record, 2000; 147: 421-422.
8. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Natural Infection of the Opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia:Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1984; 79:511.

9. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AV. Canine Visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista Instituto Tropical de São Paulo*, 2003; 45: 79-83.
10. Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, 1981; v. 41, n. 5, p.61-84.
11. Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Médica*. Atheneu, São Paulo, 2005; c. 10, v. 1, p. 67-83.
12. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, 2006; v.39, n.4, p. 337-340.
13. Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2004; v. 23, suplemento 1, p. 41-45,
14. WHO. World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Em: Sixtieth World Health Assembly, 2007; 12.3, A60/10.
15. Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991; p. 706-17.
16. Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico*, 1934; v. 48, p. 949-950.
17. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose*, 2006; p. 9.

18. Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KBF. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009; p. 570-580.
19. Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Tramontano NC, Marzochi KBF, Rangel-Filho F. – Leishmaniose Visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 1985; 1:5-17.
20. 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.
21. 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.
22. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira Epidemiologia. 2004; vol. 7, N° 3, 338-349.
23. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2001; 3;285-91.
24. Palatnick de Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Barbosa Reis A, Palatnick M. Impact of Canine Control on the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine na Hygiene, 2001; 65: 510-517.
25. Marcondes CB. Entomologia Médica e Veterinária. Editora Atheneu, 2001; 13-47.

26. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição e Habitats. In: Rangel EF, Lainson R . organizadores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, 2003; Editora Fiocruz, 207-55.
27. Costa Lima A. Sobre os Phlebótomos Americanos (Diptera, Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1932; 15-69.
28. Araujo Filho NA, Sherlock LA, Coura JR. Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. VI. Observações sobre a frequência horária e variação mensal dos transmissores. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1980; 185-195.
29. Souza MA, Sabrosa PC, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1- Flebotomíneos de área de procedência de caso humano autóctone. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1981; 76:161-168.
30. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis : a review. Medical Veterinary Entomology, 1990; 4: 1-24.
31. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A. Sussman M. editors. Topley & Wilson's Microbiology Infections. 9th Ed. London: Topley & Wilson's, 1998; 241-66.
32. Lainson R, Rangel EF,. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2005; 100:811-27.
33. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2008; 24(12): 2948-2952, 2008.
34. Foratini OP. Entomologia Médica. V. 4 São Paulo: Editora Blücher, 1973.

35. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical Veterinary Entomology*, 1998; 12:315-317.
36. de Pita- Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Brito C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay, *Acta Tropica*, 2008; 107: 66-69.
37. Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araujo Pereira T, Brito C, Brazil RP, Brandão Filho SP, *Acta Tropica*, 2010; 116(1): 108-10.
38. Soares MRA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MSCS, Barral AMP, Rebêlo JMM, Pereira SRF. Análise Molecular da Infecção Natural de *Lutzomyia longipalpis* em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 2010; 2409-2413.
39. Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafrente RS. Padronização de Condições para Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em Flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) pela Reação em Cadeia da Polimerase. *Caderno de Saúde Pública*. 2007; 87-94.
40. Rodrigues 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*, 1994; 9: 2246-2252.
41. Silva OS, Grunewald J. Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera:Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil, and *Leishmania (Viannia)* infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999; 94: 579-582.
42. 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. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine e Hygiene*, 1994; 88, 161-164.

43. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2002; 255-259.
44. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*. 2010; 81-97.
45. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 1990; 71: 267-275.
46. Maura R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Sundar S. Evaluation of PCR for Diagnosis of Indian Kala-Azar and Assessment of Cure. *Journal Clinical Microbiology*, 2005; 43(7):3038-3041.
47. Debruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kintoplast DNA, *Acta Tropica*, 1992; 52:45-58.
48. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodrigues A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X. Advantages of real time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2006; 137: 214-221.
49. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G, Real time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(5): 1666-1669.
50. Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AME. Comparison of the Especificity of PCR and the Histopathological Detection of *Leishmania* for the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002; 421-424.

51. Neitzke HC, Scodro RBL, Castro KRR, Sversutti ACD, Silveira TGV, Teodoro U. Pesquisa de Infecção Natural de Flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008; 17-22.
52. Nóbrega, LA. Marambaia Originário e História. Revista Universidade Rural, Série Ciências Humanas. Seropédica, RJ, EDUR, 2004; v. 26, n. 1-2, jan. dez, 115-123.
53. Novo, SPC. – Levantamento da Fauna de Flebotomíneos, Vetores de Leishmanioses, na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 51 p. Aprovada em Abril de 2011.
54. Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. www.incra.gov.br. 2006.
55. Galati EAB. Classificação dos Flebotomíneos. Em: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003; 23-51.
56. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1994, 89:463-469.
57. Carvalho RW, Serra-Freire NM, Souza MB. Fauna de Flebótomos da Ilha do Araújo. Município de Paraty, RJ. Diversidade e aspectos do comportamento. Parasitologia Al Dia, 1995; 19: 104-112.
58. Lima LCR, Marzochi MCA, Sabrosa PC. Flebotomíneos em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar no Bairro de Campo Grande. RJ. Brasil. Revista Brasileira de Malariologia, 1981; 33:64-74.
59. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção Natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1984; 79: 395-396.

60. Martins AV, Morales Farias EN. Sobre a distribuição geográfica dos flebotomíneos americanos (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Revista Brasileira de Biologia*, 1972; 32:361-371.
61. de 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 Tropica*, 2011; 120: 273-275.
62. Aguiar GM, Medeiros W. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. Em: Rangel EF, Lainson R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003; 207-255.
63. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 2009; 104 (7), 937-954.
64. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983; 77, 569-596.
65. Rocha LS, Falqueto A, dos Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr. G, Cupolillo E. Survey of Natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, 2010; 104, 461-466.
66. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae), occurring sympatrically in área of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002; 97, 759-765.

67. Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotômíneos em área rural no sul do Brasil. *Revista Saúde Pública*, 2006; 40(6): 1087-93.
68. Soares MRA, Rebêlo JMM, Barros VLL, Moraes JLP, Santos LS, Fonteles RS. Flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) identificados de duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis - MA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006; 39 Suppl 1:77.
69. Penha TA, Abreusilva AL, Oliveira AC, Santos ACG, Moraes JLP, Rebêlo JMM. Flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose visceral canina no Município de São Luís- Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006; 39 Suppl 1:77.
70. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Povia MM. A *Leishmania* e as leishmanioses. Em: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. V.I. Serviços de saúde pública. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1986; 83-124.
71. Lainson R, Dye C, Shaw JJ, MacDonald DW, Courtenay O, Souza AA. Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) in relation to the Fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990; 85: 135-7.
72. Ryan L, Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Ecologia de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Região Amazônica. Em: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. V. I. Serviço de saúde pública. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1986; 307-20.
73. Killick-Kendrich R. Studies and criteria for the incrimination of vector and reservoir hosts of the leishmaniasis. In: *Proceeding of the International Workshop*

- on Control Strategies for the leishmaniasis. Ottawa: International Development Research Center, 1988; 272-280.
74. Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. EA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul. Brasil. Revista de Saúde Pública, 1997; 31: 378-390.
75. Souza MB, Pujol-Luz JR, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ponte CS, Meira AM. Estudo da fauna flebotomínica em área de leishmanioses tegumentar americana e visceral, zona periurbana do bairro de Jacarepagua, Rio de Janeiro. Entomologia y Vetores, 2009; 7:365-375.
76. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Veterinary Parasitology, 2011; 179(1-3): 257-61.
77. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. Genome Research, 1996; 6: 986-994.
78. Michalsky EM, Guedes KS, Lara e Silva FO, França-Silva JC, Fortes Dias CL, Barata RA, Dias ES. Infecção Natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011; 44(1): 58-62.
79. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, 2006; 39: 337-340.
80. Higgins JA, Azard AF. Use of Polimerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. Journal Medical Entomology, 1995; 32: 213-22.

81. Aransay A, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied Environmental Microbiology*, 2000; 66: 1933-1938.

ANEXO

Produção científica

Detecção de DNA de *Leishmania infantum* em *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) capturados em área de casos autóctones de leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ

Denise Alves de Lima¹, Marcos Barbosa de Souza¹, Monique Paiva Campos², Sidney da Silva Alves¹, Fabiano Borges Figueiredo²

¹Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Departamento de Ciências Biológicas ENSP/FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos – Rio de Janeiro/RJ CEP 21041-210

² Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonose em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas IPEC/FIOCRUZ, Avenida Brasil 4.365 – Manguinhos, Rio de Janeiro/ RJ CEP: 21.040-360

Resumo: A detecção de DNA de *Leishmania infantum* em flebotomíneos foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR - convencional e em tempo real. Os flebótomos foram capturados com armadilha CDC em região de peri e intradomicílio e região de mata, na Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, região onde estão sendo notificados casos autóctones de leishmaniose visceral canina. Foram analisados 56 *pools* de fêmeas de *Nyssomyia intermedia*, 16 de *Migonemyia migonei*, contendo 10 amostras em cada um, 1 de *Lutzomyia longipalpis*, contendo apenas 6 amostras. De acordo com a PCR convencional, quatro *pools* de *N. intermedia* apresentaram produtos de amplificação para DNA de *Leishmania* sp. Com a utilização da PCR em tempo real, três *pools* de *N. intermedia* e 1 de *M. migonei* apresentaram amplificação para DNA de *Leishmania infantum*. Este resultado comprovou que a técnica da PCR em tempo real e convencional são eficientes na detecção de material genético de *Leishmania* sp. em flebotomíneos, e reforça a possibilidade de outras espécies de flebótomos, além da *L. longipalpis* estarem fazendo parte do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina no Brasil.

Palavras chave: *Lutzomyia longipalpis*, Reação em cadeia de Polimerase (PCR), leishmaniose, *Nyssomyia intermedia*

Abstract: Detection of *Leishmania infantum* DNA in sandflies was carried out using the technique of polymerase chain reaction - PCR - conventional and real-time . Sandflies were captured with CDC trap region and peri indoors and region of woods in Marambaia Island , city of Mangalore , State of Rio de Janeiro , where the region are being reported autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis . 56 pools were analyzed female *Nyssomyia intermedia*, 16 *Migonemyia migonei* , 10 samples in each one, and *Lutzomyia longipalpis* , containing only six samples. According to conventional PCR , four pools *N. intermedia* showed DNA amplification products of *Leishmania* sp. By using real-time PCR , the three pools of *N. intermedia* and 1 *M. migonei* showed DNA amplification for *Leishmania infantum* . This result proved that the PCR technique and conventional real-time are effective in detecting genetic material of *Leishmania* sp . in sandflies , and strengthens the ability of other species of sandflies , than *L. longipalpis* are part of the transmission cycle of canine visceral leishmaniasis in Brazil .

Key words: *Lutozmyia longipalpis*, polymerase chain reaction (PCR), leishmaniasis, *Nyssomyia intermedia*

1. Introdução

Leishmanioses são grupos de doenças enzoóticas e zoonóticas causadas por um parasita protozoário do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) mostrando variedade de graus de especificidade por hospedeiro (Chance, 1985). A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (Santos et al., 1998). Cães formam um importante reservatório doméstico para o agente etiológico, *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Marzochi et al. 1985), causador da Leishmaniose visceral (LV).

No estado do Rio de Janeiro, a doença foi registrada pela primeira vez em 1978, no Município do Rio de Janeiro (Marzochi et al., 2009).

Souza e colaboradores descreveram *Lutzomyia longipalpis* como principal vetor da LV no Brasil, sendo apontado em seguida por evidências epidemiológicas, como vetor desta protozoonose no Município do Rio de Janeiro. Esta espécie já havia sido coletada no Município de Mangaratiba e Angra dos Reis, anteriormente a ocorrência dos primeiros casos humanos e caninos de LV (Costa Lima, 1932; Araujo Filho et al., 1980; Souza et al., 1981).

A espécie *L. longipalpis* é a mais importante veteira da leishmaniose visceral nas Américas, e é certamente a única espécie de flebotomíneo (incluindo as associadas com a transmissão do agente etiológico de leishmaniose tegumentar) que apresenta todos os critérios estabelecidos para uma competência vetorial (Killick-Kendrick, 1990), destacando aqueles que são considerados essenciais, como antropofilia, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da doença e infecção natural por *L. infantum* (Deane, 1956; Lainson e Shaw, 1998; Lainson e Rangel, 2005).

Entretanto, é importante ressaltar que no estado do Mato Grosso do Sul, a LV também pode ser transmitida por *Lutzomyia cruzi* e, em Pernambuco, *L. migonei* está sendo incriminado como possível vetor (Santos et al., 1998; Pita Pereira et al., 2008 ; Carvalho et al., 2010).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitou a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas de DNA do parasita (Fu G. et al., 1998). Trabalhos utilizando essa metodologia têm sido realizados no diagnóstico de leishmanioses (Oliveira et al. 2003; Rodrigues et al. 2002), bem como na identificação de reservatórios animais,

detectando parasitas independentemente de sua abundância, estágio, local e transmissibilidade (Perez et al., 1994).

A Ilha da Marambaia vem apresentando casos de Leishmaniose Visceral Canina desde 2009, não apresentando até o momento nenhum registro de casos humanos. Estudos sobre a detecção de DNA de *Leishmania* sp. em flebotomíneos nesta região ainda não haviam sido realizados. Todavia, os inquéritos entomológicos têm demonstrado claramente a presença de espécies de reconhecida importância na transmissão de *Leishmania* sp., como *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei* (Novo et al. 2011) sendo que em todas elas já foi encontrado material genético de *Leishmania* sp. em outras áreas biogeográficas do país (Michalsky et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2005 ;Carvalho et al., 2010).

Tendo em vista a necessidade de estudos nesta região, bem como a compreensão de critérios epidemiológicos o presente estudo teve como objetivo a avaliação da fauna flebotomínica da região em foco e detectar, através de técnicas da PCR convencional e em tempo real a presença de DNA de *Leishmania infantum*.

2. Material e Métodos

Área de estudo - A Ilha da Marambaia (23° 04' 51" S – 44° 00' 39" W e 23° 03' 48 S – 43° 33' 96" W) faz parte do conjunto que, incluindo a Restinga, se estende por 42,5km e situa-se no litoral Sul Fluminense, na cidade de Mangaratiba. Uma descrição detalhada dos aspectos fisiográficos da região encontra-se em Novo, 2011.

Captura – As coletas iniciaram-se em julho de 2012, encerrando-se em julho de 2013. As capturas foram realizada baseada em metodologia utilizada por Novo et al. 2011

Identificação dos Flebótomos e Extração de DNA – Após o processo de triagem, os espécimes capturados foram devidamente identificados segundo Galati, 2003 e separadas por espécies e sexo. Para a identificação das fêmeas foi utilizada a técnica de dissecação. Após, as amostras foram acondicionado em tubos *ependorf* com 10 exemplares cada um, contendo álcool a 70% e encaminhados ao Instituto de Pesquisa Evandro Chagas para a extração do DNA. Para isto, foi utilizado o kit IllustraTM Tissue &

Cells Genomicprep Mini spin kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações contidas no protocolo .

Reação em cadeia de polimerase convencional e em Tempo Real – Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à técnica da PCR. Foram utilizadas as técnicas PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR) . Para a PCR convencional foi utilizado o par de oligonucleotídeos: 5' - (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC - 3' e 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA (Degrave et al. 1994) que amplificam um fragmento de 120 pb que corresponde a uma região conservada do minicírculo do kDNA (DNA cinetoplasto) de espécies do gênero *Leishmania* sp. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 2%, impregnado por gelred, submetidos a uma corrida de 80V por aproximadamente 2h. O volume final foi de 25,0 µl. Foi utilizado o marcador de tamanho de DNA de 100pb (pares de base) na concentração de 1µg/µL, aplicado em um “slot” do gel de agarose. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho de sistema digital L-PIX HE (Loccus Biotecnologia®, São Paulo, Brasil). Para a qPCR, as amostras foram amplificadas utilizando sistema TaqMan® na plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®). Cada amostra foi realizada em duplicata. A sonda e os iniciadores foram desenhados para visar as regiões conservadas do DNA de *L. infantum*. Os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTT TCCCGCC-3') e a sonda TaqMan- (FAM- 5'AAAATGGGTGCAGAAAT- 3'- NFQ –MGB) utilizadas foram descritos anteriormente no protocolo de Francino et al.2006.

As amostras também foram submetidas à quantificação do DNA pela plataforma Qubit® Fluorometric.

Após a realização da técnica da PCR, as amostras negativadas foram submetidas ao teste de inibição, que consiste em repetir toda a reação nas mesmas condições, adicionando 05 µl de 10⁶ DNA de *Leishmania infantum* em cada pool negativo.

4. Resultados

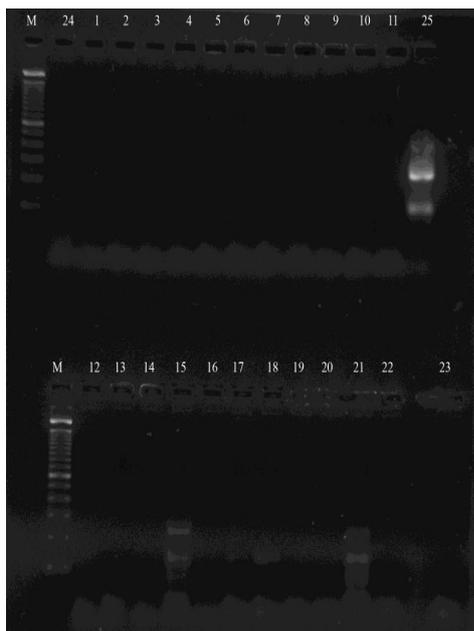
Durante doze meses de estudo realizado na ilha da Marambaia, foram capturados 1239 espécimes de flebotomíneos, das quais 674 foram fêmeas e 565 foram machos.

As coletas ocorreram entre os meses de julho de 2012 a julho de 2013 em três sítios de coletas: região peri e intradomiciliar e região de mata. A espécie *N. intermedia*, foi capturada em maior densidade com 1017 exemplares. Da espécie *M. migonei* foram capturados 543 espécimes e *L. longipalpis*, apresentou menor densidade, com apenas 40 exemplares capturados. A espécie *Pintomyia fischeri* teve apenas três exemplares capturados.

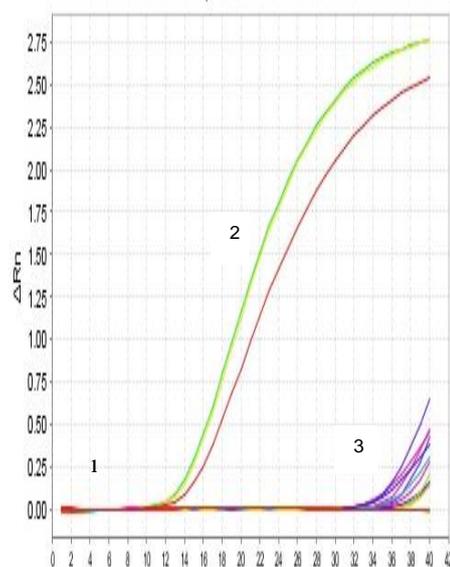
Todas as fêmeas foram analisadas pela técnica PCR convencional e em tempo real. Somando um total de 684 fêmeas, os pools, contendo 10 espécimes cada um, foram agrupados da seguinte maneira: 51 pools de *N. intermedia*, 16 de *M. migonei* e 1 de *L. longipalpis* com apenas 6 espécimes.

Quatro pools de *N. intermedia* (15, 17, 18 e 21) apresentaram produtos de amplificação para o gênero *Leishmania sp.* através da análise pela técnica da PCR convencional (figura 1), enquanto os de *L. longipalpis* não apresentaram amplificação. As amostras tiveram suas reações da PCR e eletroforese repetidas para confirmação do resultado. Em seguida, foram submetidas à técnica da PCR em tempo real (qPCR) (figura2). Três pools de *N. intermedia* (33, 15 e 17) e um de *M. migonei* (55) apresentaram produtos de amplificação para a espécie *Leishmania infantum* através da técnica qPCR (tabela 1).

O teste de inibição foi realizado com 60 pools, cuja PCR apresentou resultado negativo. Destes pools, 42 são de *N. intermedia* e 18 de *M. migonei*. De acordo com este teste, 14 pools não sofreram amplificação, sendo 11 de *N. intermedia* e três de *M. migonei*.



1. PCR convencional: Produtos de amplificação para o gênero *Leishmania* sp. realizada em fêmeas de flebotomíneos. Amostras 15, 17, 18 e 21 positivas para *Leishmania* sp.; 24. Controle negativo, 25. Controle positivo, M. Marcador de peso molecular



2 PCR real time: Curva de amplificação para a espécie *Leishmania infantum*; C_T - Cycle Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas no processo: (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) amplificação da curva padrão (controle positivo) realizada em triplicata: a quantidade de produtos da PCR aumenta a cada ciclo e (3) amplificação das amostras: cada cor representa uma amostra. Considera-se resultados positivo, a amostra que sofreu amplificação até o Ct 36

Tabela 1: Detecção de DNA de *Leishmania* sp. e *Leishmania infantum* na Ilha da Marambaia

Espécie	Fêmeas	Pools	PCR*	qPCR**
<i>N. intermedia</i>	510	51	4	3
<i>M. migoney</i>	160	16	-	1
<i>L. longipalpis</i>	6	1	-	-

* Pools positivos para *Leishmania* sp.

** Pools positivos para *Leishmania infantum*

5. Discussão

A técnica da PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de doenças em seres humanos e animais, devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Rodgers et al., 1990; Silva et al., 2011). Além do diagnóstico em hospedeiros, a PCR também pode ser utilizada na detecção de agentes infecciosos em vetores. Segundo De Bruijn & Barker, (1992) a presença de um único parasita de *Leishmania* sp. em flebotomíneo seria suficiente para sua detecção pela técnica de PCR.

Para a pesquisa de DNA de *Leishmania* sp. em flebotomíneos neste estudo, foram aplicadas duas técnicas de PCR, a convencional e em tempo real. Em ambas as técnicas

foi possível detectar material genético do parasito, entretanto, a PCR em tempo real foi capaz identificar *Leishmania infantum*, sem a necessidade da utilização de sequenciamento ou outros procedimentos e em um período tem tempo reduzido. Isso foi possível pela utilização do sistema TaqMan® que é baseado no uso de iniciadores e a sonda de hidrólise desenhados especificamente para região interna da sequência, o que impede a formação de produtos inespecíficos, e com isso, conferindo alta especificidade a técnica (Heid et al. 1996).

Dentre as três espécies de flebotomos analisadas neste estudo, *L. longipalpis* é a principal vetora incriminada na transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. Esta espécie foi encontrada naturalmente infectada no Estado de Minas Gerais por Michalski et al. 2011 e no Estado do Maranhão por Soares et al. 2010. Entretanto, no *pool* analisado, não foi amplificado DNA de *Leishmania* nessa espécie. Essa negatividade pode ser justificada pela utilização de um único *pool*, aliado ao baixo número de exemplares capturados para a presente pesquisa.

A espécie *M. migonei* apresentou produto de amplificação para DNA de *Leishmania infantum* através da técnica da PCR em tempo real. Este resultado corrobora com os estudos realizados por Carvalho et al. 2010, no Estado de Pernambuco, onde esta espécie foi encontrada naturalmente infectada e atualmente vem sendo incriminada como principal vetora da LV. Segundo os autores, a baixa densidade da espécie *L. longipalpis* aliado a detecção de DNA de *Leishmania* em *M. migonei* justificam essa suspeita.

Além do estudo realizado em Pernambuco, Missawa et al. 2011 confirmaram a participação da *L. cruzi* como vetora da LV no Estado de Mato Grosso.

O resultado mais importante de nosso estudo foi o encontro três *pools* de *N. intermedia* com produtos amplificados de *Leishmania infantum* pela PCR em tempo real. Este resultado fortalece a possibilidade de uma nova espécie de flebotomíneo atuar como vetora em áreas endêmicas de LV. Esse achado pode seguir os mesmos critérios defendidos para participação da *M. migonei* no ciclo de transmissão da LV, entre os quais, a baixa densidade de *L. longipalpis* ou a não notificação de sua presença e a alta densidade de *N. intermedia*.

Não podemos esquecer que para a confirmação dessa hipótese serão necessários que estudos relacionados à competência vetorial como antropofilia, distribuição espacial de acordo com a área de transmissão, incidência de casos humanos e infecção natural por *L. infantum* (Deane, 1956; Lainson e Shaw, 1998; Lainson e Rangel, 2005) sejam realizados.

Em outros dois *pools* de *N. intermedia* foi possível a amplificação pela PCR convencional. Esse resultado sugere que nesses dois casos o material genético seja de *L. braziliensis*, visto que *N. intermedia* é a principal vetora incriminada na transmissão da leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro (Rocha et al. 2010; Aguiar et al. 1996; Souza et al. 2009). Esses *pools* não foram amplificados pelo qPCR específico de *L. infantum*

De acordo com o teste de inibição, onze *pools* de *N. intermedia* e três de *M. migonei* não apresentaram produtos de amplificação. Este fato pode ser explicado devido a presença de inibidores do PCR na identificação do parasito dentro do próprio inseto. De acordo com Paiva et al. 2007 e Higgins & Azard, 1995 os insetos possuem em seus tecidos inibidores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR, majoritariamente em exoesqueleto, cabeça e tórax. Neitzke et al. 2008 justificou a ocorrência da inibição em seu estudo pela presença de substâncias interferentes presentes no conteúdo digestório destes insetos capazes de diminuir a sensibilidade da PCR. De acordo com Paiva et al. 2007, a mínima quantidade de DNA perdido durante o processo de extração em insetos pode gerar resultados negativos. No estudo presente, para o processo de lavagem das amostras não foi utilizado fenol/cloforofórmio/álcool isoamílico, reagentes que segundo Aransay et al. 2000 agem como inibidores que podem afetar a atividade enzimática do DNA polimerase, entretanto, para o processo de maceração do inseto foi utilizado todo o tecido abdominal do inseto incluindo conteúdo digestório, o que pode ter provocado a ocorrência da inibição.

Em decorrência do resultado obtido pelo teste de inibição, concluímos que poderíamos ter obtido um número positivo de amostras ainda maiores.

O uso da PCR convencional e em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania sp.* em flebotomíneos apresenta muitas vantagens, entre as quais a possibilidade de identificação precisa do parasita no inseto vetor com iniciadores específicos, revelando-se como um instrumento de grande importância em saúde pública.

A detecção de DNA de *Leishmania infantum* em *N. intermedia*, associada à baixa densidade de *L. longipalpis* e ausência de casos humanos na região, reforça a ideia de que uma nova espécie possa estar atuando como vetora da LVC na região estudada. Embora este resultado não confirme a sua participação no ciclo de transmissão da LV, o presente estudo abre uma nova perspectiva para o conhecimento epidemiológico e de controle da LV.

7. Referências Bibliográficas

- Aguiar, G.M., Medeiros, W.M., de Marco, T.S., Santos, S.C., Gambardella, S., 1996. Ecologia dos Flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 12(2): 195-206.
- Aransay A., Scoulica E., Tselentis Y. 2000. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplasmic DNA. Applied Environmental Microbiology. 66: 1933-1938.
- Araujo Filho, NA., Sherlock L.A. & Coura JR, 1980. Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. VI. Observações sobre a frequência horária e variação mensal dos transmissores. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical p. 185-195.
- Carvalho, M.R., Valença, H.F., Silva, F.J., Pita-Pereira, D., Pereira, T.A., Britto, C., Brazil, R.P., Filho, S.P.B, 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica, 116: 108-110.
- Chance, M.L, 1985. The biochemical and immunological taxonomy of Leishmania. Em: Chang, K.P. & Bray, R.S. Leishmaniasis. Amsterdam, Elsevier, p. 93-110.
- Costa Lima, A, 1932. Sobre os Phlebótomos Americanos (Diptera, Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, p. 15-69.
- De Bruijn, M.H.L & Barker, D.C, 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica (Basel), 52: 45-58.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology, 137:214-221.

- Gontijo, C.M.F., Melo, M.N., 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, p.338-349.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P.M., 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Higgins J.A., Azard A.F. 1995. Use of Polimerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. *Journal Medical Entomology*. 32: 213-22.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Medical Veterinary Entomology*, 14: 1-24.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100:811-27.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1998. New World Leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: Collier L., Balows A. Sussman M. editors. *Topley & Wilson's Microbiology Infections*. 9th Ed. London: Topley & Wilson's. 241-66.
- Marzochi, M.C.A., Coutinho, S.G., Sabroza, P.C., Souza, M.A., de, Toledo, L.M. de, Filho, F.B.R., 1985. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, R. 432-446.
- Marzochi, M.C.A., Fagundes, A., Andrade, M.V., Souza, M.B., Madeira, M.F., Mouta-Confort, E., Schubach, A.O., Marzochi, K.B.F., 2009. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 570-580
- Michalsky, É. M., Guedes, K. S., Lara e Silva, F. O., França-Silva, J. C., Fortes Dias, C. L., Barata, R.A., Dias, E. S., 2011. Infecção Natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(1): 58-62.
- Missawa, N.A., Lima, G.B.M., 2006. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba. 39(4): 337-340.
- Neitzke, H.C., Scodro, R.B.L., Castro, K.R.R, Sversutti, A.C.D., Silveira, T.G.V., Teodoro, U. 2008. Pesquisa de Infecção Natural de Flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(1): 17-22.

- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(5): 1666-1669.
- Novo, S.P.C., Souza, M.B., Villanova, C.B., Meródio, J.C., Meira, A.M., 2011. Survey of sandfly vectors of leishmaniasis in Marambaia Island, municipality of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(2): 231-3.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P, Galati, E.A.B, Andrade Junior, H.F., Malafrente, R.S. 2007. Padronização de Condições para Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em Flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) pela Reação em Cadeia da Polimerase. *Caderno de Saúde Pública*. 87-94.
- de Pita Pereira, D. Cardoso, M.A.B, Alves, C.R., Brazil R.P., Brito,C., 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominea) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Tropica*. 107: 66-69.
- Rocha, L.S., Falqueto, A., Santos, C.B., Ferreira, A.L., Graça, G.C.da, Grimaldi Jr., G., Cupolillo, E., 2010. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104:461-466
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D. F., 1990. Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol*. 71: 267-275.
- Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.A., Malacco, M.A.F., 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical Veterinary Entomology*. 12:315-317.
- Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., de Paiva Hoffmann M., de Freitas R.A., Malacco, M.A., 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol*. 12: 315-317.
- Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., de Souza C.M., Figueiredo, F.B., 2011. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology*. 30;179(1-3):257-61.
- Soares, M.R.A.S., Carvalho, C.C., Silva, L.A., Lima, M.S.C.S., Barral, A.M. P., Rebêlo, J.M.M., Pereira, S.R.F., 2010. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia*

- longipalpis* em area endemic leishmaniose visceral no Brasil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 26(12): 2409-2413.
- Souza, M.B.de, Carvalho, R.W.de, Machado, R.N.M., Wermelinger, E.D., 2009. Flebotomíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 53 (1): 147-150.
- Souza, M.A., Sabrosa, P.C., Souza, Marzochi, M.C.A., Coutinho, S.G., Souza, W.J.S., 1981. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1- Flebotomíneos de área de procedência de caso humano autóctone. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 76:161-168.
- Souza, M.B., Marzochi, M.C.A., Carvalho, R.W., Ribeiro, P.C., Pontes, C.S., Caetano, J.M., Meira, A.M., 2003. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública. 19:109-118.