

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Flebotomíneos insulares e infecção natural de *Nyssomyia neivai* por *Leishmania*, sul do Brasil

Maringá
2014

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Flebotomíneos insulares e infecção natural de *Nyssomyia neivai* por *Leishmania*, sul do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ueslei Teodoro

Maringá
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Flebotomíneos insulares e infecção natural de *Nyssomyia neivai* por *Leishmania*, sul do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Ueslei Teodoro

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Mara Cristina Pinto

Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a. Sandra Mara Alessi Aristides

Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 21/02/2014

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *câmpus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Dedico a Ele, não apenas por mais esta conquista, mas por ter colocado em meu caminho todas as pessoas que foram essenciais para a realização deste trabalho, especialmente aos meus pais Onélia Aparecida Andreo dos Santos e Osvaldo Alves dos Santos e ao meu noivo Marcelo Torres Liberati.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conduzir meu caminho e estar presente em minha vida em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis, em que estive triste e esgotada.

Ao Prof. Dr. Ueslei Teodoro, meu orientador, pela amizade, disponibilidade, competência e dedicação.

À minha família, principalmente aos meus pais, Osvaldo Alves dos Santos e Onélia Aparecida Andreo dos Santos, pelo apoio, incentivo e compreensão, pois sem eles, com toda a certeza, nada seria possível.

Agradeço especialmente ao meu noivo, Marcelo Torres Liberati, por toda sua dedicação, paciência, confiança, carinho e amor. Meu porto seguro, que me conforta, apóia e incentiva. Está presente em todos os momentos que mais preciso de sua ajuda e, que sempre fará parte da minha vitória.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, principalmente à Prof^ª. Dr^ª. Thais Gomes Verzignassi Silveira por ter apoiado o presente trabalho, minha admiração e respeito.

À todas as minhas amigas, principalmente às confidentes, Thaís R. Ranucci e Jaqueline C. Gasparotto, que sempre me ajudaram na realização deste trabalho. À Herintha C. Neitzke-Abreu, que nunca mediu esforços para colaborar na pesquisa. Em especial agradeço à amiga Kárin R. Reinhold-Castro, pois sem ela esta pesquisa não teria sido concluída. A Kárin proporcionou-me muito mais do que conhecimento, esteve presente em todos os meus passos e decisões e me dispensou muita paciência durante toda a produção deste trabalho.

Ao José Luiz Filho, Valmir Ortiz da Silva e José do Porto dos Santos do Núcleo de Entomologia de Porto Rico (14^a Regional de Saúde) pelo auxílio na captura dos flebotomíneos.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, em especial à Olívia Abeche, por todas as orientações, gentileza e paciência com que me tratou.

Aos moradores das ilhas de Porto Rico, por serem sempre receptivos, prestativos e pelo modo compreensivo com que nos trataram durante a execução das coletas de flebotomíneos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) por fornecer-me a bolsa de mestrado.

EPÍGRAFE

O futuro tem muitos nomes. Para os fracos é o inalcançável, para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes é a oportunidade.

(Victor Hugo)

RESUMO

As leishmanioses são amplamente distribuídas e têm grande impacto na saúde pública mundial. No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) tem sido notificada em todos os estados e a leishmaniose visceral em vinte e um. Este estudo teve como objetivo determinar a fauna e investigar a taxa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos de ilhas do rio Paraná, no estado do Paraná. Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas de Falcão nas ilhas Mutum, Bandeira, Carioca e Fina, situadas na parte média do Alto Rio Paraná, noroeste do estado do Paraná. Após a identificação, exemplares fêmeas de *Nyssomyia neivai* foram submetidas à técnica Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR) para a detecção de *Leishmania*. Para a realização desta técnica foram empregados dois pares de iniciadores: i) MP3H e MP1L para amplificação do fragmento de 70-pb da região do minicírculo do cinetoplasto do subgênero *Leishmania*; e ii) 5Llcaac e 3Llcaac, que amplificam um fragmento de 220-pb da região do gene *IVS6* da cacofonia em insetos do gênero *Lutzomyia*, que exercem função de controle interno da reação. Foram coletados e identificados 19.818 exemplares de *Ny. neivai*, dos quais 16.746 fêmeas e 3.072 machos, além de dois exemplares fêmeas de *Ny. whitmani* e uma fêmea de *Psathyromyia shannoni*. Do total de 378 (38 *pools*) fêmeas de *Ny. neivai* submetidas à PCR detectou-se um exemplar (0,26%) infectado por *Leishmania* (*Viannia*) sp., considerando-se um inseto infectado para cada *pool* positivo. Desta forma, constata-se a importância desta espécie na epidemiologia da LT, uma vez que esta espécie tem sido frequentemente assinalada com infecção natural por protozoários do gênero *Leishmania*. Além disso, a densidade populacional, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a antropofilia, a adaptação desse inseto nos ambientes antrópicos e as condições climáticas são fatores que favorecem a persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania* em áreas endêmicas de LT. A detecção de *Ny. neivai* com infecção natural por *Leishmania* na ilha Mutum evidencia a necessidade de trabalhos de investigação sobre o comportamento de flebotomíneos nas ilhas do rio Paraná, principalmente aquelas com habitantes permanentes e temporários, e a necessidade da intervenção dos serviços de saúde pública para o uso de medidas de controle da população desses insetos.

Palavras-chave: Flebotomíneos, *Nyssomyia neivai*, Leishmaniose tegumentar, Múltipla-PCR, *Leishmania*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are widely distributed and have great impact on public health worldwide. In Brazil, cutaneous leishmaniasis (CL) has been reported in all states and visceral leishmaniasis in twenty-one. This study aimed to determine the fauna and investigate the rate of natural infection by *Leishmania* in sandflies of islands of the Paraná River, in the state of Paraná. Sandflies were collected with Falcão traps in islands Mutum, Bandeira, Carioca and Fina, situated in the middle part of the Upper Paraná River, northwest of the state of Paraná. After identification, the female specimens of *Nyssomyia neivai* were subjected to Multiplex Polymerase Chain Reaction technique (Multiplex-PCR) for detection of *Leishmania*. To perform this technique were employed two pairs of primers: i) MP3H and MP1L for amplification of fragment 70-bp region of the minicircle kinetoplast of *Leishmania* subgenus and ii) 5Llcac and 3Llcac, which amplify a fragment of 220-bp region the cacophony gene IVS6 in insects of the genus *Lutzomyia*, exercising internal control function of reaction. Were collected and identified specimens of *Ny. neivai* 19,818 of which 16,746 females and 3,072 males, and two female specimens of *Ny. Whitmani* and one *Psathyromyia shannoni* female. Of the total of 378 (38 pools) females of *Ny. neivai* subjected to Multiplex-PCR was detected in an exemplary (0.26 %) infected by *Leishmania (Viannia)* sp. considering an insect infected for each positive pool. Thus, we see once again the importance of this species in the epidemiology of CL, since this species has often been marked by natural infection by protozoa of the genus *Leishmania*. In addition, population density, geographic distribution, frequency outside the home and domicile, the anthropophily, the adaptation of this insect in anthropic environments and climatic conditions are factors that favor the persistence of enzootic cycle of *Leishmania* in endemic areas of CL. The detection *Ny. neivai* naturally infected by *Leishmania* in island Mutum highlights the need for research on the behavior of sandflies in the islands of the Paraná River, especially those with permanent and temporary residents, and the need for intervention by public health services for the use of measures population control of these insects.

Keywords: Sandflies, *Nyssomyia neivai*, Cutaneous Leishmaniasis, Multiplex-PCR, *Leishmania*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A) Rio Paraná onde se localiza as ilhas em que foram coletados os flebotomíneos, nos municípios de Porto Rico e Querência do Norte, estado do Paraná, sul do Brasil; B) Canal fechado (ressaco) resultante da anexação da barra lateral na ilha Mutum, no rio Paraná, município de Porto Rico.....	31
Figura 2 Múltipla-PCR mostrando os fragmentos de 70-pb da região do minicírculo do k-DNA do subgênero <i>Leishmania</i> amplificado com os iniciadores MP3H e MP1L e 220-pb da região do gene <i>IVS6</i> da cacofonia de insetos do gênero <i>Lutzomyia</i> amplificado com os iniciadores 5Llcac e 3Llcac.....	32
Tabela 1 Total de exemplares de <i>Ny. neivai</i> coletados nas ilhas do rio Paraná, nos municípios de Porto Rico e Querência do Norte, estado do Paraná, sul do Brasil, em junho, agosto e outubro de 2012.....	33

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): Journal of Vector Ecology. Disponível em: <[http://....](http://...)>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	16
1.1	Histórico.....	16
1.2	Leishmanioses.....	16
1.3	Epidemiologia.....	17
1.4	<i>Leishmania</i> spp.....	17
1.5	Flebotomíneos.....	18
1.6	Justificativa.....	19
1.7	Objetivos.....	19
1.8	Referências.....	20
2	CAPÍTULO II.....	23
2.1	Artigo 1: Flebotomíneos insulares e infecção natural de <i>Nyssomyia neivai</i> por <i>Leishmania</i> , sul do Brasil.....	23
3	CAPÍTULO III.....	38
3.1	Conclusões.....	38
3.2	Perspectivas futuras.....	39
4	ANEXO.....	40

CAPÍTULO I

HISTÓRICO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, com relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C. (LAINSON, 1997; CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Na América do sul, cerâmicas pré-colombianas, de 400 a 900 anos d.C., produzidas pelos índios do Peru apresentam mutilações de lábios e nariz características da leishmaniose cutaneomucosa (SANTOS e COIMBRA, 1994).

No Brasil, Cerqueira em 1855 observou doenças da pele que identificou clinicamente como botão de Biskra. Contudo, as lesões cutâneas e nasofaríngeas de leishmaniose só foram confirmadas no Brasil, pela primeira vez em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas no interior do Estado de São Paulo (PESSOÃ, 1982). Gaspar Vianna, em 1911 denominou o agente etiológico da leishmaniose, conhecida como “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir, de *Leishmania braziliensis*” (SILVEIRA et al., 1997).

No Brasil, até a década de 70, todos os casos de LT eram atribuídos a *Leishmania braziliensis*, mas com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos, mais seis espécies de *Leishmania* foram descritas até o momento (BASANO e CAMARGO, 2004).

No estado do Paraná, há registro de casos de LT desde o início do século passado até 1958 (BRASIL, 2007). Após um período de quiescência a doença voltou a ser oficialmente notificada em 1980, mantendo-se endêmica desde então em diversos municípios do referido estado (TEODORO et al., 1991, 2010).

LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças com distinto espectro clínico e epidemiológico, representando um agravo importante de saúde pública. As leishmanioses têm as seguintes formas clínicas: i) leishmaniose visceral - a forma mais grave apresenta períodos de febre, perda de peso gradual, anemia, e leucopenia. Os linfonodos aumentam, ocorre esplenomegalia e hepatomegalia, a medula óssea, os rins, pulmões e o trato gastrointestinal podem ser afetados; em algumas situações, há história de úlceras cutâneas persistentes que cicatriza lentamente; ii) leishmaniose cutânea - caracteriza-se por úlceras, nódulos solitários ou múltiplos na pele, com lento desenvolvimento, e que habitualmente cicatrizam

espontaneamente; iii) leishmaniose mucocutânea - as úlceras são crônicas e localizam-se nas cavidades orais e nasais (WHO, 2010).

EPIDEMIOLOGIA

A LT possui ampla distribuição mundial, com notificação em 98 países. Na América, o Brasil é o país onde há maior ocorrência, com 90% dos casos de todo o continente e um grande impacto na saúde pública (WHO, 2010, 2013). A LT ocorre em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2011) apresentando diferenças clínicas e epidemiológicas de acordo com a região do país (BRASIL, 2009).

A LT ocorre em 286 dos 399 municípios do estado do Paraná (LIMA et al., 2002; BRASIL, 2012), com registro 94,9% dos 13.161 casos notificados na região sul do Brasil de 1990 a 2011.

***LEISHMANIA* spp**

Os agentes etiológicos da LT são espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae). A doença não é contagiosa, tem evolução crônica, acomete as estruturas da pele e cartilagens nasofaríngeas, de forma localizada ou difusa (BASANO e CAMARGO, 2004).

Os protozoários *Leishmania* se apresentam sob a forma amastigota, que são estruturas arredondadas ou ovaladas e atuam como parasito intracelular do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (RASO e GENARO, 1994).

Os vetores são flebotomíneos (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae) que sugam o sangue de um animal mamífero infectado com as formas amastigotas, as quais se alojam no intestino do inseto, onde se transformam em promastigotas, que se apresentam sob formas alongadas e têm um longo flagelo livre. No sistema digestório do vetor, as promastigotas se multiplicam por divisão simples e assexuada, migram para o aparelho bucal do inseto onde permanecem e podem ser inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, junto com a saliva (NEVES et al., 2005).

No Brasil as sete espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, que causam a LT são: *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie de maior importância pela sua distribuição de norte a sul, em áreas de colonização antigas ou recentes, ocasionando lesões cutâneas e mucosas no homem e em cães domésticos; *Leishmania (Viannia) guyanensis*, ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Roraima, ocasiona a forma cutânea, com múltiplas lesões, mas pode acometer a mucosa; *Leishmania (Viannia) naiffi* ocorre nos

estados do Pará e Amazonas, ocasiona lesão que evolui de forma benigna; *Leishmania (Viannia) shawi* é responsável por casos esporádicos no Maranhão e Pará; *Leishmania (Viannia) lainsoni*, descrita no Acre, Pará e Roraima; *Leishmania (Viannia) lindenberg*, presente no Pará, até o momento foi isolada apenas de casos humanos; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ocorre no Norte (Amazonas, Pará, Acre e Rondônia), Nordeste (Maranhão e Bahia), Sudeste (Minas Gerais), Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul) e no Sul (Paraná e Santa Catarina), é responsável pela forma cutânea e ocasionalmente pela forma cutânea-difusa anérgica (BRASIL, 2007).

FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos fazem parte de um grupo de insetos hematófagos, que são responsáveis pela transmissão dos parasitos que causam as leishmanioses. Estes insetos têm porte reduzido, raramente ultrapassam 0,5 cm de comprimento, as pernas são longas e delgadas e o corpo densamente piloso. Têm como característica o voo saltitante e a manutenção das asas eretas, quando estão em repouso, ao contrário de outros dípteros. Somente as fêmeas de flebotomíneos têm aparelho bucal apropriado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Apresentam vários nomes populares que varia segundo o país, estado ou região. No Brasil são conhecidos como mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua e arrupiado (REBÊLO, 1999).

No Brasil são relatadas 260 das 480 espécies de flebotomíneos descritos na região Neotropical (SHIMABUKURO e GALATI, 2011) e apenas algumas delas estão envolvidas no ciclo de transmissão de *Leishmania*.

As espécies *Nyssomyia neivai* (Pinto), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Migonemyia migonei* (França), *Lutzomyia shannoni* (Dyar) estão presentes na maioria das localidades estudadas no estado do Paraná e têm relevância na epidemiologia da LT (TEODORO et al., 2006; REINHOLD-CASTRO et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Os criadouros de flebotomíneos se localizam em detritos nas fendas de rocha, cavernas, raízes de vegetação no solo, entre folhas mortas e úmidas (REBÊLO, 1999).

A investigação sobre a fauna e o comportamento das diferentes espécies de flebotomíneos é de extrema importância para encontrar meios para controlar a população desses dípteros (TEODORO e KÜHL, 1997). O conhecimento da distribuição geográfica dos flebotomíneos se torna fundamental para a compreensão das características relativas à epidemiologia das leishmanioses, indicando as áreas onde há risco de transmissão destas parasitoses (MELO, 2009).

JUSTIFICATIVA

A LT é uma zoonose de grande impacto na saúde pública. No Paraná incide em todo o estado, principalmente em municípios das mesorregiões Norte-Central, Noroeste e Norte Pioneiro Paranaense (MEMBRIVE et al., 2004; TEODORO et al., 2006; SILVA et al., 2008; TEODORO et al., 2010). Onde é endêmica e a maioria dos casos tem ocorrido na zona rural, na presença de capões de matas nativas modificadas, situadas em áreas de abrangência das bacias hidrográficas dos rios Ivaí, Pirapó, Tibagi, Cinzas e Laranjinha (LIMA et al., 2002; MONTEIRO et al., 2009).

Apesar dos diversos estudos realizados no estado do Paraná, as ilhas do rio Paraná ainda não foram contempladas com o desenvolvimento de pesquisas sobre a fauna, o comportamento de flebotomíneos e a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* para esclarecer a epidemiologia da LT nestas ilhas, uma vez que há notificação da doença em habitantes permanentes e indivíduos que as frequentam em busca de lazer (pesca, praia, turismo). As pesquisas podem vir a auxiliar os trabalhos de vigilância sanitária e a escolha de medidas de controle de flebotomíneos que possam ser incorporadas na rotina da população humana que vive nas ilhas. A redução da densidade desses insetos no peridomicílio e domicílio podem diminuir a incidência da LT nos habitantes permanentes e indivíduos que frequentam as ilhas em atividades de lazer.

OBJETIVOS

GERAL

Verificar a fauna de flebotomíneos e investigar a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* utilizando a técnica da múltipla-PCR em áreas endêmicas para LT nas ilhas do rio Paraná, no estado do Paraná.

ESPECÍFICOS

Identificar a fauna de flebotomíneos das ilhas Mutum, Bandeira, Carioca e Fina, no rio Paraná, município de Porto Rico e Querência do Norte, na mesorregião noroeste do estado do Paraná.

Verificar a frequência de flebotomíneos na mata e em abrigos de animais domésticos, os fatores bióticos (flora e a presença de animais silvestres) e abióticos (temperatura, umidade e pluviosidade) que podem interferir na dinâmica populacional desses insetos.

Pesquisar a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia)*.

REFERÊNCIAS

- BASANO, A.S.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: <http://goo.gl/mPcbz> (Acessado em 19/09/2013).
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/svs> (Acessado em 19/09/2013).
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 2011. Disponível em: <http://goo.gl/62Phou> (Acessado em 3/08/2013).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, de 1990 a 2011. 2012. Disponível em: <http://goo.gl/ijNPy> (Acessado em 19/12/2013).
- CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas brava e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 1, p. 34-37, 2003.
- LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 11, p. 29-40, 1997.
- LIMA, A.P.; MINELLI, L.; COMUNELLO, E.; TEODORO, U. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 681-692, 2002.
- MELO, S.C.C.S. Fauna e frequência de flebotomíneos em localidades rurais no município de Bandeirantes, Estado do Paraná. 26 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá), Maringá, Paraná, 2009.

- MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; MEMBRIVE, U.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Flebotomíneos de municípios do Norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Entomology Vectors**, v. 11, p. 673-680, 2004.
- MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U.; FERREIRA, M.E.M.C. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 327-330, 2009.
- NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 11 ed., São Paulo:, Atheneu, 2005.
- PESSÔA, S.M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- REBÊLO, J.M.M. **Flebótomos vetores das leishmanioses**. Manual para técnicos e profissionais de Saúde. São Luis: Universidade Federal do Maranhão. Ministério da Saúde, 1999.
- REINHOLD-CASTRO, K.R.; SCODRO, R.B.L.; DIAS-SVERSUTTI, A.C.; NEITZKE, H.C.; ROSSI, R.M.; KÜHL, J.B.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 269-276, 2008.
- RASO, P.; GENARO, O. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In: BRASILEIRO G.F., et al. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SANTOS, R.V.; COIMBRA, J.R.C.E.A. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Revista Biota Neotropica**, v. 11, p. 685-704, 2011.
- SILVA, A.M.; CAMARGO, N.J.; SANTOS, D.R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A.C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E.C.; KONOLSAISEN, J.F.; ISETTO, J.R.A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E.A.B. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera:

Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 3, p. 209-225, 2008.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In: LEÃO, R.N.Q. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: CEJUP, 1997.

TEODORO, U.; SALVIA FILHO L.A.V.; LIMA, E.M.; MISUTA, N.M.; VERZIGNASSI, T.G.; FERREIRA, M.E.M.C. Leishmaniose tegumentar: flebotomíneos de área de transmissão na região norte do Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, p.129-133, 1991.

TEODORO, U.; KÜHL, J.B. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 512-516, 1997.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 327-330, 2006.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SILVA, A.M.; MASSAFERA, R.; IMAZU, L.E.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE-ABREU, H.C. Fauna de Flebotomíneos em Municípios do Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 322-330, 2010.

WHO. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. Disponível em: <http://goo.gl/1WxXs> (Acessado em 19/09/2013).

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <http://goo.gl/PiM9n> (Acessado em 19/09/2013).

CAPÍTULO II

Artigo 1: “FLEBOTOMÍNEOS INSULARES E INFECÇÃO NATURAL DE *Nyssomyia neivai* POR *Leishmania*, SUL DO BRASIL”

FLEBOTOMÍNEOS INSULARES E INFECÇÃO NATURAL DE *Nyssomyia neivai* POR
Leishmania, SUL DO BRASIL

¹Barbara Andreo dos Santos, ¹Kárin Rosi Reinhold-Castro, ¹Herintha Coeto Neitzke-Abreu,
¹Thaís Regina Ranucci, ¹Thaís Gomes Verzignassi Silveira, ²Edilson Colhera Cristovão e
¹Ueslei Teodoro

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil, Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900, uteodoro@uem.br, Fax:
55 44 3011-4860

²Núcleo de Entomologia, Porto Rico – Paraná/Secretaria de Saúde do Paraná.

RESUMO

As leishmanioses têm sido notificadas em 98 países e têm grande impacto na saúde pública mundial. No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) ocorre em todos os estados e a leishmaniose visceral em vinte e um. Verificou-se a fauna de flebotomíneos e a taxa de infecção natural por *Leishmania* destes insetos, provenientes de ilhas do rio Paraná, no estado do Paraná. Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas de Falcão nas ilhas Mutum, Bandeira, Carioca e Fina. Após a identificação, os exemplares fêmeas de *Nyssomyia neivai* foram submetidas à técnica da Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR) para a detecção de *Leishmania*. Foram coletados e identificados 19.818 exemplares de *Ny. neivai*, dos quais 16.746 fêmeas e 3.072 machos, além de duas fêmeas de *Ny. whitmani* e uma fêmea de *Psathyromyia shannoni*. De 378 (38 pools) fêmeas de *Ny. neivai* submetidas à múltipla-PCR detectou-se a taxa de infecção de 0,26%, considerando-se um inseto infectado para cada pool positivo. Desta forma, constata-se a importância desta espécie na epidemiologia da LT. Além disso, a densidade populacional, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a antropofilia, a adaptação desse inseto nos ambientes antrópicos e as condições climáticas são fatores que favorecem a persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania* em áreas endêmicas de LT. A detecção de *Ny. neivai* com

infecção natural por *Leishmania* na ilha Mutum evidencia a necessidade de trabalhos de investigação sobre o comportamento de flebotomíneos nas ilhas do rio Paraná, principalmente aquelas com habitantes permanentes e temporários, e a necessidade da intervenção dos serviços de saúde pública para o uso de medidas de controle da população desses insetos.

Palavras-chave: Flebotomíneos, *Nyssomyia neivai*, Leishmaniose tegumentar, Múltipla-PCR, *Leishmania*.

Introdução

A distribuição geográfica e a importância de flebotomíneos na epidemiologia das leishmanioses têm norteado os estudos sobre a fauna, biologia e ecologia desses insetos nos continentes onde eles estão presentes (WHO, 2013). Tais estudos buscam o encontro de meios de controlar o desenvolvimento da população de flebotomíneos e evitar a infecção humana por *Leishmania*. A distribuição das espécies de flebotomíneos pode ser influenciada por fatores abióticos (temperatura, pluviosidade, relevo, tipo de solo, entre outros) e bióticos (flora e fauna de mamíferos). Assim, as variações específicas desses dípteros de um local para outro está vinculada à riqueza da fauna de mamíferos e aves e à presença de matas remanescentes (Lima et al., 1988; Silva et al., 2008; Monteiro et al., 2009).

As alterações ambientais por causas naturais e antrópicas induzem a adaptação das espécies de flebotomíneos nos novos ambientes. No ambiente antrópico estes insetos encontram refúgio em abrigos de animais domésticos, paióis e outras edificações e fontes sanguíneas, no peridomicílio (Teodoro et al., 2007). As habitações humanas de má qualidade em locais insalubres, a presença de abrigos de animais domésticos, o acúmulo de matéria orgânica e a ausência de saneamento básico são fatores que propiciam a formação de criadouros de flebotomíneos no peridomicílio e a incidência da leishmaniose tegumentar (LT) nas zonas rurais do Paraná (Lima et al., 1988). A variedade de espécies e o tamanho da população dos flebotomíneos nos ambientes antrópicos dependem do grau de degradação da área estudada e da existência de fontes alimentares, representadas principalmente pelos animais domésticos (Silva et al., 2008).

No Brasil a presença de flebotomíneos tem sido constatada em todos os estados e, de aproximadamente 500 espécies que ocorrem no Novo Mundo, 260 são brasileiras e destas, 43 ocorrem no estado do Paraná (Aguiar e Medeiros, 2003; Shimabukuro e Galati, 2011). A LT tem sido notificada em todos os estados brasileiros e, no estado do Paraná, abrange 286 dos 399 municípios, onde diversos estudos foram realizados, disponibilizando informações sobre

a distribuição geográfica, a biologia, o comportamento, a taxa de infecção por *Leishmania* e de medidas que visam evitar o contato do homem e de animais domésticos com os flebotomíneos (Membrive et al., 2004; Teodoro et al., 2006; Silva et al., 2008; Teodoro et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Neitzke-Abreu et al., 2013; Reinhold-Castro et al., 2013)

A realização de estudos sobre flebotomíneos e da taxa de infecção natural por *Leishmania* têm importância para verificar a competência vetorial de espécies destes insetos. Para tanto, os métodos moleculares têm se mostrado eficientes, específicos e sensíveis, a exemplo da técnica da Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR) (Perez et al., 1994; Rodríguez et al., 1994; Michalsky et al., 2002; Kato et al., 2005).

Apesar dos diversos estudos realizados no estado do Paraná, nas ilhas do rio Paraná inexitem pesquisas sobre a fauna, o comportamento e a taxa de infecção natural de flebotomíneos para esclarecer a epidemiologia da LT. As ilhas, no Alto Rio Paraná, têm morfologia, idade e gênese diferentes, comumente são formadas por anexação de barras e têm padrão "anabanching" (multicanal) (Souza Filho e Stevaux, 1997; Leli et al., 2013). Na ilha Mutum há notificação de três casos humanos (dois habitantes permanentes e um temporário) e de oito cães que se infectaram por *Leishmania* (Informação pessoal de Edilson C. Cristovão e Norberto A. Membrive). O conhecimento do comportamento de flebotomíneos pode indicar os meios para o controle desses insetos, que podem ser incorporados na rotina da população humana que vive nas ilhas. Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar a fauna, verificar a frequência na mata, no peridomicílio e domicílio e pesquisar a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, em ilhas do rio Paraná.

Materiais e Métodos

As coletas de flebotomíneos foram realizadas nas ilhas Mutum, Bandeira e Carioca, muito próximas entre si, localizadas no município de Porto Rico (53°16' O e 22°46' S). As coletas também foram realizadas na ilha Fina a aproximadamente 60 km das ilhas anteriores, no município de Querência do Norte. As ilhas Mutum e Bandeira têm dez e cinco habitantes, respectivamente. As quatro ilhas estão situadas na parte média do Alto Rio Paraná, na mesorregião noroeste do estado do Paraná (Figura 1.A). As ilhas estão inseridas na Área de Proteção Ambiental (APA) das Ilhas e Várzeas do Rio Paraná. O clima é do tipo subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes e com tendência à concentração de chuvas e geadas esporádicas. A temperatura média é superior a 22°C no verão e inferior a 18°C no inverno, sem estação seca

definida (Aguiar et al., 2007). A vegetação das ilhas é do tipo floresta estacional semidecidual, com uma fauna de mamíferos representada por 34 espécies e uma avifauna com espécies neárticas migratórias (Aguiar et al., 2007).

O Alto Rio Paraná apresenta um sistema de arquipélagos fluviais com ilhas em grande parte formadas por anexação de barra lateral (Souza Filho e Stevaux, 1997). Neste trecho, o rio Paraná tem padrão anabranching (multicanal) e apresenta a separação dos canais por ilhas e barras. As ilhas têm morfologia, idade e gênese diferentes e comumente são formadas por anexação de barras (Leli et al., 2013). Na formação das ilhas, os “ressacos” desempenham um estágio importante, pois nas anexações de barras, a ilha tem crescimento lateral e aumenta sua estabilidade conforme mais barras forem anexadas (Figura 1.B) (Leli et al., 2013). “Ressaco” é um termo regional usado para denominar um canal fechado que se forma entre uma ilha ou banco e uma barra lateral. Este ambiente se desenvolve, normalmente, nas margens laterais das ilhas, mas pode se desenvolver, também, nas margens do canal, embora seja menos comum (Leli et al., 2013). O canal é fechado à montante e aberto na jusante, onde a conexão com as águas do canal ocorre normalmente, mas sem fluxo e evidencia bem um ambiente lântico (Leli et al., 2013). Os canais fechados desempenham um papel importante na morfologia, com a sucessão das seguintes fácies sedimentares: i) fase canal – na base há material arenoso, geralmente com estratificações; ii) fase abandono de canal – há cobertura por material areno-lamoso podendo ter poucos restos vegetais, iii) fase lagoa – cobertura com lama plástica podendo ou não ter um pouco de areia fina; iv) fase pântano – há material lamoso podendo ser plástico e depende do teor orgânico; v) fase terrestreização – acima de todos ambientes deposicionais, o material é composto de solo desenvolvido, geralmente grumoso e com muitas raízes (Leli et al., 2013).

As coletas de flebotomíneos foram realizadas com armadilhas de Falcão, em junho, agosto e outubro de 2012. Os flebotomíneos foram coletados nos seguintes ecótopos, na ilha Mutum: casa, galinheiro, margem da mata (1 e 2), pocilga e poleiro; Ilha Bandeira: canil, casa, casa desabitada, galinheiro, interior da mata, margem da mata (1 e 2) e poleiro; Ilha Carioca: casa desabitada, margem da mata (1, 2 e 3) e pocilga desativada; e Ilha Fina: canil, casa, galinheiro, interior da mata, margem da mata (1, 2, 3 e 4). Em junho foram realizadas duas coletas, das 18 às 6 horas, nas ilhas Mutum e Bandeira, num total de 24 horas. Em agosto foram realizadas coletas nas ilhas Mutum, Bandeira e Carioca, das 18 às 23 horas, num total de 5 horas. Em agosto foi realizada apenas uma coleta na ilha Fina, das 18 às 6 horas. Nas ilhas Mutum e Bandeira foram realizadas 29 horas de coletas. Calculou-se a média horária (MH) de flebotomíneos capturados em cada um dos ecótopos de todas as ilhas. Os

flebotomíneos coletados foram sacrificados com clorofórmio e acondicionados em *ependorf* contendo álcool 80%, para conservação e posterior identificação. A identificação foi realizada no Laboratório de Entomologia da Universidade Estadual de Maringá. As fêmeas de flebotomíneos foram colocadas em lâminas de vidro, previamente lavadas com hipoclorito a 2% e desinfetadas em álcool a 70%, contendo uma gota de salina estéril 0,9% e sob microscopia estereoscópica, foram feitos pequenos cortes na porção final do abdômen para a exposição da spermateca. Em seguida a lâmina foi coberta com lamínula e examinada ao microscópio óptico (400X), para a identificação da espécie. A nomenclatura utilizada é de Galati (2003) e a abreviação de Marcondes (2007). Após a identificação, os insetos foram conservados em *ependorfs* contendo isopropanol, em *pools* com 9 a 10 espécimes da mesma espécie, para posterior extração do DNA.

Para a detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos foi utilizada a técnica da múltipla-PCR, que tem elevada sensibilidade e especificidade, independente do estágio, localização e do baixo número de parasitos no trato digestório do inseto vetor (Perez et al., 1994; Medeiros et al., 2002; Michalsky et al., 2002). O uso de um segundo par de iniciadores na múltipla-PCR, para controle interno da reação, confere segurança ao resultado, pois detecta a possibilidade de interferência do exoesqueleto de artrópodes na reação (Higgins e Azard, 1995; Siridewa et al., 1996).

O processamento dos flebotomíneos foi realizado no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá. A extração do DNA foi realizada segundo Oliveira et al. (2011). Os *pools* de fêmeas de flebotomíneos foram macerados com espátula estéril em tampão de lise (50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 50 mM Tris-HCL pH 7,4, Triton X-100 1% e 10 mM DTT) e para a extração foi utilizada solução de isotiocianato de guanidina e fenol. O DNA foi ressuspensionado em 20 µL de H₂O destilada e estocado a 4°C até o uso. Para cada 22 amostras extraídas foi utilizado um controle positivo [machos de flebotomíneos acrescido de 10⁵ promastigotas de *L. (V.) braziliensis*] e um controle negativo (machos de flebotomíneos).

Para amplificação do DNA foram utilizados dois pares de iniciadores: MP3H (5'-GAA CGG GGT TTC TGT ATG C-3') e MP1L (5'-TAC TCC CCG ACA TGC CTC TG-3'), que amplificam um fragmento de 70-pb da região conservada do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) do subgênero *Leishmania* (Lopez et al., 1993); e os iniciadores 5Llac (5'-GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG-3') e 3Llac (5'-CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC-3'), que amplificam um fragmento de 220-pb da região do gene *IVS6* da cacofonia em insetos do gênero *Lutzomyia* (Lins et al., 2002). A mistura de reação (volume final de 25 µL) continha:

0,5 μM de cada um dos iniciadores (Invitrogen Life Technologies, São Paulo Brasil), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 mM de MgCl_2 , 1X Tampão de enzima e 2 μL de DNA. A amplificação foi realizada em Termocicladora PC (Biometra, Alemanha) a 94°C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos (1,5 minutos a 95°C; 1,5 minutos a 57°C; 2 minutos a 72°C) (Oliveira et al. 2011). A extensão foi continuada a 72°C por mais 10 minutos e os tubos foram mantidos a 4°C até a análise da amplificação. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), corado pelo brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 10-15 V/cm. Para cada 6 amostras foi utilizado um controle positivo [1 pg de DNA de *L. (V.) braziliensis*] e um controle negativo (água). A presença de bandas foi verificada em transiluminador (Macro Vue™ UV-20, Hoefer).

Resultados

Foram coletados 19.818 exemplares de *Nyssomyia neivai* (Pinto), dos quais 16.746 fêmeas e 3.072 machos (Tabela 1), além de 2 exemplares fêmeas de *Ny. whitmani* (Antunes e Coutinho) e 1 fêmea de *Psathyromyia shannoni* (Dyar). Na ilha Mutum capturou-se o maior número de exemplares de *Ny. neivai* (MH 489,00), especialmente no ecótopo poleiro (MH 408,14) (Tabela 1). Na ilha Bandeira, do total capturado (MH 134,59), também no ecótopo poleiro capturou-se o maior número de exemplares de *Ny. neivai* (MH 71,83) (Tabela 1). Na ilha Carioca (desabitada) a maioria dos exemplares de *Ny. neivai* (MH 188,80) foram capturados principalmente na margem da mata 1 (MH 67,20) e na pocilga desativada (MH 67,00) (Tabela 1). Na ilha Fina, nos ecótopos casa (MH 16,66), galinheiro (MH 23,66) e margem da mata 2 (MH 23,50) capturou-se o maior número de exemplares de *Ny. neivai* (Tabela 1). Os exemplares de *Ny. whitmani* foram capturados na ilha Bandeira e o exemplar de *Ps. shannoni* foi capturado na ilha Carioca.

Do total de 378 (38 *pools*) fêmeas de *Ny. neivai* submetidas à múltipla-PCR detectou-se um exemplar (0,26%) infectado por *Leishmania (Viannia)* sp., considerando-se um inseto infectado para cada *pool* positivo (Figura 2).

Discussão

Apenas três espécies, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Ps. shannoni*, foram coletadas e identificadas nas ilhas onde se realizou o trabalho. Anteriormente, Gasparotto et al. (dados não publicados) detectaram exemplares de *Ny. neivai* e de uma única fêmea de *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira) na ilha Mutum. O número de espécies coletadas é pequeno frente às 43

espécies descritas no estado do Paraná (Aguiar e Medeiros, 2003), possivelmente pelo isolamento das ilhas e pela incapacidade de outras espécies se adaptarem no ambiente insular ou por não conseguirem atingir as ilhas devido à distância da margem do rio Paraná.

A espécie *Ny. neivai* predomina, quase absolutamente, em todas as ilhas onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos. Nos ecótopos galinheiro e poleiro capturou-se a MH de 529,91 do total coletado (MH 878,20) desta espécie, principalmente no poleiro da ilha Mutum (MH 408,14). *Ny. neivai* predomina em vários municípios do estado do Paraná, alguns com áreas de solo similar ao das ilhas em pauta, principalmente em abrigos de animais domésticos, inclusive em municípios com áreas de solo similar ao das ilhas em pauta (Teodoro et al., 2006; Reinhold-Castro et al., 2008; Cerino et al., 2009; Teodoro et al., 2010). A detecção de *Ny. neivai* infectado por *Leishmania* no município de Doutor Camargo, onde houve casos autóctones de LT, mostra a importância desta espécie na epidemiologia da LT no Paraná (Reinhold-Castro et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Neitzke-Abreu et al., 2013).

O domínio de *Ny. neivai* (99,9%) sugere que essa espécie vem se adaptando muito bem nas ilhas do rio Paraná, onde se constata a presença de aves e mamíferos (Aguiar et al., 2007) e de ambiente favorável à procriação de insetos. Acredita-se que *Ny. neivai* migrou da mata ciliar das margens desse rio, provavelmente na última fase de formação das ilhas (fase terrestreização) (Leli et al., 2013). As sucessivas soldaduras de barras para a formação da ilha Mutum sugerem que esta ilha tem aproximadamente 8.200 anos (Leli et al., 2013). A espécie *Ny. neivai* ocorre em matas e se adapta muito bem às suas bordas e nos ambientes modificados, podendo se desenvolver no peridomicílio e invadir o domicílio (Membrive et al., 2004; Teodoro et al., 2006; 2010). Esta espécie está presente no litoral e interior da região sul, no oeste de São Paulo, Paraná, sul e oeste de Minas Gerais, sul de Goiás e sul do Pará, além de Argentina, Bolívia e Paraguai (Andrade-Filho et al., 2007).

Do total de 378 fêmeas de flebotomíneos submetidas à múltipla-PCR, se constatou a infecção natural de 0,26% (1/38 *pools*) da espécie de *Ny. neivai*, coletada na ilha Mutum. Os trabalhos referentes à infecção natural de flebotomíneos mostram que o número de insetos infectados pode ser baixo, por sofrerem influência de fatores bióticos, tais como o tamanho da população de mamíferos reservatórios, a taxa de infecção destes e as barreiras que o parasito encontra para se reproduzir no tubo digestório do inseto vetor (Pimenta et al., 2003). Por meio da técnica da PCR, diferentes autores encontraram infecção natural por *Leishmania* em espécie de *Ny. neivai*. Córdoba-Lánus et al. (2006) encontraram uma taxa de infecção de 9,1% em 440 fêmeas, enquanto Marcondes et al. (2009) detectaram 13,1% em 562 fêmeas,

Pita-Pereira et al. (2009) 1,11% em 270 fêmeas e Oliveira et al. (2011) 0,23% em 1.755 fêmeas.

A infecção por *Leishmania* de *Ny. neivai* corrobora a importância desta espécie na epidemiologia da LT, uma vez que esta espécie tem sido encontrada com infecção natural. A densidade populacional, a frequência no peridomicílio e domicílio e a adaptação nos ambientes antrópicos desses insetos são fatores favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania*. Estes fatos evidenciam a necessidade de trabalhos de investigação sobre o comportamento de flebotomíneos, incluindo a taxa de infecção, cujos resultados podem ser um indicador da necessidade da intervenção dos serviços de saúde pública para o desencadeamento de medidas de controle da população desses insetos, uma vez que as ilhas do rio Paraná são frequentadas por turistas em busca de lazer, praia e pesca, ficando comprovada a importância do controle desses vetores nesta região.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado. Aos guardas de endemias do Núcleo de Entomologia de Porto Rico (14ª Regional de Saúde): José Luiz Filho, Valmir Ortiz da Silva e José do Parto dos Santos, pelo auxílio na captura dos flebotomíneos. Ao Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual pela disponibilidade dos materiais que foram necessários para o desenvolvimento da pesquisa. Ao Professor Doutor José C. Stevaux e a doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Geografia Isabel T. Leli pelas informações sobre a gênese das ilhas do rio Paraná.

Referências

- Aguiar, G.M. e W.M. Medeiros. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF e Lainson R. (eds) pp. 207-255. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz.
- Aguiar, L.M., G. Ludwig, W.K. Svoboda, C.L.S. Hilst, I.T. Navarro and F.C. Passos. 2007. Occurrence, local extinction and conservation of Primates in the corridor of the Upper Paraná River, with notes on other mammals. *Revista Brasileira de Zoologia*. 24 (4): 898-906.
- Andrade-Filho, J.D., E.A.B. Galati and A.L. Falcão. 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

- geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102: 481-487.
- Cerino D.A., U. Teodoro and T.G.V. Silveira. 2009. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in the Urban Area of the Municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. Neotropical Entomology. 38(6):853-858.
- Córdoba-Lanús, E., M.L.D. Grosso, J.E. Piñero, B. Valladares, and O.D. Salomón. 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. Acta Trop. 98: 1-5.
- Galati, E.A.B. 2003. Morfologia e Taxonomia. In: Rangel, E.F. e Lainson, R. (eds) pp. 23-206. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz.
- Guilherme, A.L.F., E.S. Lorosa, A.L. Costa, G.C. Pavanelli e M.A. Silvana. 2001. *Pansstrongylus megistus* em ecótopos artificiais de ilhas do alto rio Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34(5): 491-494.
- Higgins, J.A. and A.F. Azard. 1995. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. J. Med. Entomol. 32:213-222.
- Kato, H., H. Uezato, K. Katakura, M. Calvopiña, J.D. Marco, P.A. Barroso, E.A. Gomez, T. Mimori, M. Korenaga, H. Iwata, S. Nonaka, and Y. Hashiguchi. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72: 87-93.
- Leli, I.T., J.C Stevaux e M.L. Assine. 2013. Canal fechado (ressaco) em grandes sistemas de rios anabranching: exemplo do alto curso do rio Paraná. Anais do Sexto Simpósio Regional sobre Hidráulica de Rios. Santa Fe, Argentina, pp. 1-6.
- Lima, L.C., M.C.A. Marzochi, P.C. Sobroza e M.A. Souza. 1988. Observações sobre a leishmaniose tegumentar, cinco anos após profilaxia. Rev Saúde Pública. 22:73-77.
- Lins, R.M., S.G. Oliveira, N.A. Souza, R.G. de Queiroz, S.C. Justiniano, R.D. Ward, C.P. Kvriacou, and A.A. Peixoto. 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. Insect. Mol. Biol. 11: 117-122.
- Lopez, M., R. Inga, M. Cangalaya, J. Echevarria, A. Lanos-Cuentas, C. Orrego, and J. Arevalo. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 348-356.
- Marcondes, C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. 2007. Entomol. News. 118: 351-356.

- Marcondes, C.B., I.A. Bittencourt, P.H. Stoco, I. Eger, E.C. Grisard, and M. Steindel. 2009. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 1093-1097.
- Medeiros, A.C.R., S.S. Rodrigues and A.M.F. Roselino. 2002. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 421-424.
- Membrive, N.A., G. Rodrigues, U. Membrive, W.M. Monteiro, H.C. Neitzke, M.V.C. Lonardoni, T.G.V. Silveira e U. Teodoro. 2004. Flebotomíneos de municípios do norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Entomol Vectores.* 11: 673-680.
- Michalsky, É.M., C.L. Fortes-Dias, P.F.P. Pimenta, N.F.C. Secundino e E.S. Dias. 2002. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 44: 255-259.
- Monteiro, W.M., H.C. Neitzke, T.G.V. Silveira, M.V.C. Lonardoni, U. Teodoro, e M.E.M.C. Ferreira. 2009. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 25: 1083-1092.
- Neitzke-Abreu, H.C., K.R. Reinhold-Castro, M.S. Venazzi, R.B.L. Scodro, A.C. Dias, T.G.V. Silveira, U. Teodoro and M.V.C Lonardoni. 2013. Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in southern Brazil.
- Oliveira, D.M., K.R. Reinhold-Castro, M.V.Z. Bernal, C.M.O. Legriffon, M.V.C. Lonardoni, U. Teodoro, and T.G.V. Silveira. 2011. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11: 137-143.
- Perez, J.E., E. Ogusuku, R. Inga, M. Lopez, J. Monje, L. Paz, E. Nieto, J. Arevalo, and H. Guerra. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 161-164.
- Pimenta, P.F.P., N.F.C Secundino and E.E.N. Blanco. 2003. Interação vetor-hospedeiro. In: Rangel, E. F, Lainson, R.; (Org.). *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 275-289.
- Pita-Pereira, D., G.D. Souza, A. Zwetsch, C.R. Alves, C. Britto, and E.F. Rangel. 2009. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south

- Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 593–595.
- Reinhold-Castro, K.R., R.B.L. Scodro, A.C. Dias-Sversutti, H.C. Neitzke, R.M. Rossi, J.B. Köhl, T.G.V. Silveira e U. Teodoro. 2008. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41(3):269-276.
- Reinhold-Castro, K.R., V.C. Fenelon, R.M. Rossi, J.E.C Brito, J.S. Freitas and U. Teodoro. 2013. Impact of control measures and dynamics of sand flies in southern Brazil. *J Vector Ecol.* 38:63-68.
- Rodríguez, N., B. Guzman, A. Rodas, H. Takiff, B.R. Bloom, and J. Convit, 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2246-2252.
- Shimabukuro, P.H.F. and E.A.B. Galati. 2011. Lista de espécies de Phebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop.* 11: 685-704.
- Silva, A.M., N.J. Camargo, D.R. Santos, R. Massafra, A.C. Ferreira, C. Postai, E.C. Cristiano, J.F. Konolsaisen, J.R.A. Bisetto, R. Perinazo, U. Teodoro e E.G.B. Galati. 2008. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado do Paraná, sul do Brasil. *Neotrop Entomol;* 37:209-25.
- Siridewa, K., E.H. Karunanaya and N.V. Chandrasekharan. 1996. Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples hydrocele fluid, and mosquito vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 72-76.
- Souza-Filho, E.E. e Stevaux, J.C. 1997. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Curitiba, Ivinheima. In: A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Ed. A.E.A.M. Vazzoler; A.A. Agostinho e N.S. Hahn. EDUEM: Nupélia, Maringá, pp. 3-46.
- Teodoro, U., D.R. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, L.P. Poiani, A.M. Silva, H.C. Neitzke, W.M. Monteiro, M.V.C. Lonardon, T.G.V. Silveira. 2006. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. *Rev Saúde Pública.* 40: 327-330.
- Teodoro, U., M.V.C. Lonardon, T.G.V. Silveira, A.C. Dias, M. Abbas, e D. Alberton. 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 41(3): 383-388.
- Teodoro, U., D.R. Santos, A.M. Silva, R. Massafra, L.E. Imazu, W.M. Monteiro e H.C. Neitzke-Abreu. 2010. Fauna de Flebotomíneos em Municípios do Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. *Rev Pat Trop.* 39:322-330.

World Health Organization. Leishmaniasis. 2013. <http://goo.gl/PiM9n> Acessado em 21/01/2013.

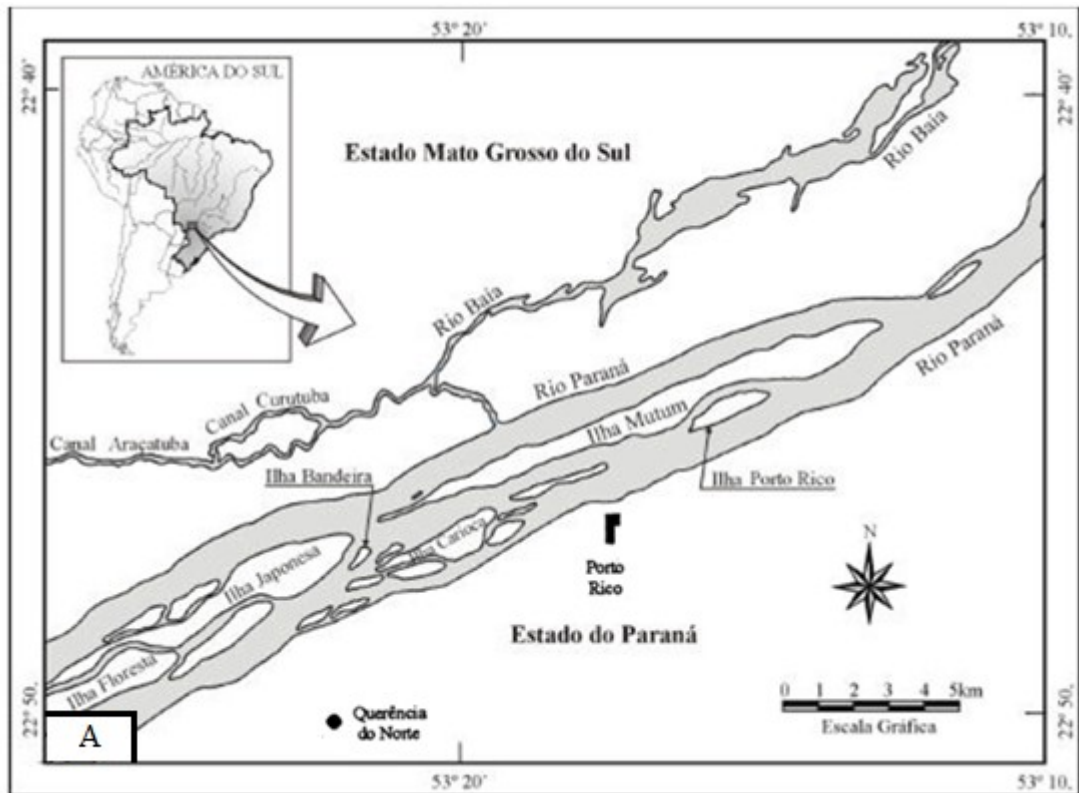


Figura 1. A) Rio Paraná onde se localiza as ilhas em que foram coletados os flebotomíneos, nos municípios de Porto Rico e Querência do Norte, estado do Paraná, sul do Brasil (Guilherme et al., 2001); B) Canal fechado (ressaco) resultante da anexação da barra lateral na ilha Mutum, no rio Paraná, município de Porto Rico (Leli et al., 2013).

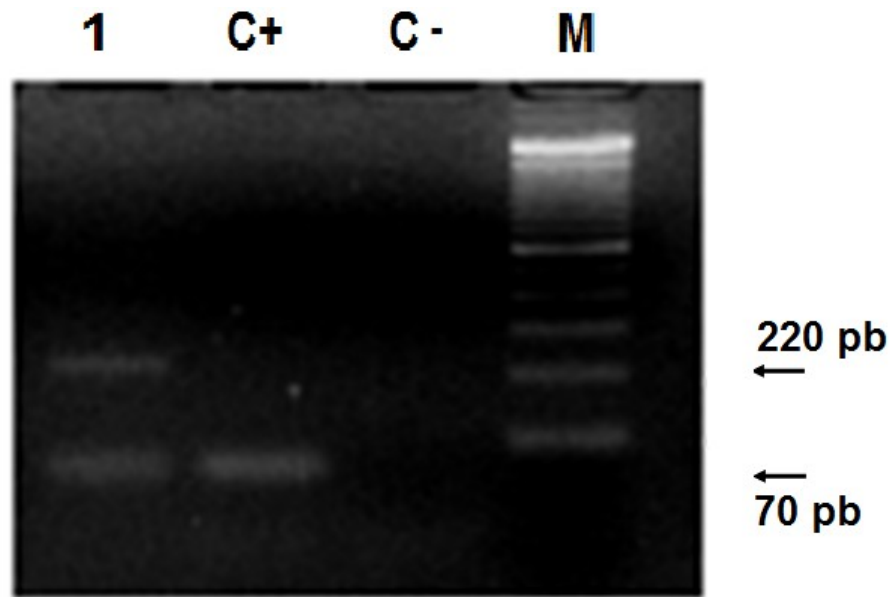


Figura 2. Múltipla-PCR mostrando os fragmentos de 70-pb da região do minicírculo do k-DNA do subgênero *Leishmania* amplificado com os iniciadores MP3H e MP1L e 220-pb da região do gene *IVS6* da cacofonia de insetos do gênero *Lutzomyia* amplificado com os iniciadores 5Llcaac e 3Llcaac. Raia 1: amostra positiva de *pool* de flebotomíneos; Raia C+: controle positivo de amplificação [DNA de promastigotas de *L. (V) braziliensis*]; Raia C-: controle negativo de amplificação (água); Raia M: marcador molecular de 100-pb.

Tabela 1. Total de exemplares de *Ny. neivai* coletados nas ilhas do rio Paraná, nos municípios de Porto Rico e Querência do Norte, estado do Paraná, sul do Brasil, em junho, agosto e outubro de 2012.

Espécie	<i>Nyssomyia neivai</i>			
	Macho	Fêmea	Total	Média horária
Ilha Mutum/Ecótopo				
Casa	23	245	268	9,24
Galinheiro	59	543	602	20,76
Margem mata 1	108	1.227	1.335	46,03
Margem mata 2	7	48	55	1,90
Pocilga	13	72	85	2,93
Poleiro	1.851	9.985	11.836	408,14
Subtotal	2.061	12.120	14.181	489,00
Ilha Bandeira/Ecótopo				
Canil	53	150	203	7,00
Casa	74	521	595	20,52
Casa desabitada	127	333	460	15,86
Galinheiro	28	132	160	5,52
Interior da mata	5	147	152	5,24
Margem mata 1	15	9	24	0,83
Margem mata 2	57	169	226	7,79
Poleiro	483	1.600	2.083	71,83
Subtotal	842	3.061	3.903	134,59
Ilha Carioca/Ecótopo				
Casa desabitada	-	200	200	40,00
Margem mata 1	24	312	336	67,20
Margem mata 2	8	32	40	8,00
Margem mata 3	5	28	33	6,60
Pocilga desativada	27	308	335	67,00
Subtotal	64	880	944	188,80
Ilha Fina/Ecótopo				
Canil	7	9	16	1,33
Casa	-	200	200	16,66
Galinheiro	52	232	284	23,66
Interior da mata	1	3	4	0,33
Margem mata 1	1	1	2	0,17
Margem mata 2	42	240	282	23,50
Margem mata 3	1	-	1	0,08
Margem mata 4	1	-	1	0,08
Subtotal	105	685	790	65,81
Total	3.072	16.746	19.818	878,20

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Apesar da pequena diversidade de espécies de flebotomíneos nas ilhas do rio Paraná, a frequência desses insetos, especialmente no ambiente humano (peridomicílio e domicílio) e a detecção de *Leishmania* em *Ny. neivai* mostram a existência do ciclo enzoótico de *Leishmania* nos ambientes insulares. Fica evidente a necessidade de se investigar o comportamento de flebotomíneos nas ilhas do rio Paraná, tendo em vista que os resultados poderão nortear os serviços de saúde pública na utilização de medidas mais apropriadas para o controle desses insetos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O fato de ter sido detectada a infecção natural de flebotomíneos em espécie de *Ny. neivai*, significa que a verificação desta taxa, é importante para os serviços de vigilância nas áreas onde a LT é endêmica, uma vez que as ilhas do rio Paraná são frequentadas por turistas em busca de lazer, praia e pesca, ficando comprovada a importância do controle desses vetores nesta região. Daí a necessidade do serviço especializado de entomologia médica nos departamentos de saúde dos municípios para o monitoramento da densidade populacional de vetores da LT, assim como de outros vetores, a exemplo da dengue e esquistossomose nos municípios onde há possibilidade de ocorrência das doenças referidas.

ANEXO

Normas da revista: Journal of Vector Ecology

Journal of Vector Ecology

Copyright © 2013 Society for Vector Ecology



Edited By: Dr. Marc J. Klowden, University of Idaho

Online ISSN: 1948-7134

Author Guidelines

Papers may be published as conventional Research Articles or shorter Scientific Notes, which are less than 8 typed pages and do not require an Abstract. Manuscripts should be organized under the following headings: Title Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if appropriate), References Cited, tables in spreadsheet format, figure legends, and figures. The title page should contain the names of all authors and their affiliations as well as the corresponding author's mailing address, e-mail, and fax number. The abstract should also include a keyword index containing no more than six words that best describe the paper. Illustrations that are submitted must be of high quality and remain legible after reduction. References should be formatted to conform to the style in recent volumes. Authorship is confined only to those directly involved in the conduct, analysis, and writing of the manuscript, and all authors should have knowledge of and approval for its submission.

Manuscripts to be considered for publication should be submitted on-line at <http://mc.manuscriptcentral.com/jve>. Review of manuscripts generally takes 8 weeks before a decision for publication is reached