

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

THAÍS REGINA RANUCCI

Investigação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia)*, no  
sul do Brasil

Maringá  
2013

THAÍS REGINA RANUCCI

Investigação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia)*, no 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  
2013

# FOLHA DE APROVAÇÃO

THAÍS REGINA RANUCCI

Investigação de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* em flebotomíneos  
no norte do estado do Paraná, 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

Dra Mara Cristina Pinto  
Universidade Estadual Paulista

Dra Maria Dalva de Barros Carvalho  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 25 de março de 2013.

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

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por ter colocado em meu caminho todos os anjos da guarda que me protegeram e não mediram esforços para a realização desse sonho, e a todos que, como eu, são apaixonados por saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem o apoio, estímulo empenho e colaboração dos “anjos da guarda” que surgiram na minha vida. Por isso gostaria de expressar minha gratidão a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para que meu sonho se tornasse realidade.

A Deus, por me ter dado a mãe maravilhosa que tenho, que me apoiar desde o início e soube fazer o papel de mãe e pai, não deixando que nada me faltasse. É meu exemplo de vida, mulher guerreira, batalhadora, alegre, sempre me transmitiu ótimas energias e é graças a ela que hoje meu coração está repleto de alegria. Foram vários os dias que me fez companhia para chegar até Maringá e aguardou o término das aulas para retornarmos a Bandeirantes. Obrigada meu anjo da guarda número um. Mãe te amo muito, a senhora é minha inspiração de vida!

Ao meu pai Darcy, que através de uma luz divina me acompanhou e protegeu durante toda minha caminhada. Saudade!

Ao Professor Dr. Ueslei Teodoro, por ter acreditado em mim. Como professor orientador foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e no meu sucesso.

Ao professores doutores, Wuelton Marcelo Monteiro, Dennis Armando Bertolini, Sandra Mara Alessi Aristides Arraes e Sueli Donizete Borelli por terem aceitado participar da banca de qualificação, minha gratidão e respeito.

Ao meu irmão Gustavo, amigo fiel, que suportou minha ansiedade, minhas ausências e nunca deixou de sonhar comigo na realização deste trabalho. A ele e à minha cunhada Juliana, meus eternos agradecimentos por todo apoio e por terem me dado o melhor presente que poderia ter ganho, o meu afilhado Davi, trazendo força, alegria, amor e companheirismo a minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Gomes Verzignassi Silveira por ter acreditado e apoiado este estudo, minha admiração e respeito.

Às minhas amigas e colaboradoras do trabalho, Bárbara e Jaqueline, minhas companheiras fiéis, que além de me acolherem nas suas casas, sempre me apoiaram, me animaram e ajudaram na realização deste trabalho. À Herintha, que me encorajou e não mediu esforços para colaborar na pesquisa. Em especial agradeço à Kárin, que me transmitiu muitos

conhecimentos, foi fundamental na realização deste trabalho, uma amiga fiel, dedicada e que esteve comigo nos melhores e piores momentos até a conclusão deste sonho.

Ao grande amor da minha vida, José Augusto, pelo seu amor, carinho, admiração, e pela presença incansável com que me apoiou ao longo do período de elaboração desta dissertação, suportando minhas ausências e preocupações. Meu companheiro fiel, meu amigo confiante. Por este amor não medi esforços para, da melhor maneira, finalizar este importante desafio.

Aos guardas de endemias do Serviço de Vigilância da Saúde (Ministério da Saúde), Rubens Massafra, Valdecir Aparecido Fagundes, Clovis Spiacci Pereira, José Carlos Lavorato, Helio Aparecido Barbosa e Nivaldo Paulino, pela disposição e alegria que transmitiam durante as coletas de flebotomíneos, pela seriedade e compromisso com o trabalho.

A todos os meus familiares e amigos pelo incentivo e momentos de alegria que me proporcionaram. Estarão sempre no meu coração!

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, em especial à Olivia, pela grande gentileza e paciência com que me tratou.

Ao Reinaldo Marqui, pela dedicação com que me ajudou nas coletas. À Magali que sempre acreditou nesta realização, aguentou minhas ausências e trabalhou em dobro. À Renata Chaves, pelo carinho e confiança que sempre depositou em mim.

Aos meus colegas da Comissão de Assistência Farmacêutica no Serviço Público do Conselho Regional de Farmácia do Paraná que sempre me incentivaram e remarcavam as reuniões para que eu pudesse participar.

## EPÍGRAFE

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.

Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

(DALAI LAMA)

## Investigação de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia)*, no sul do Brasil

### RESUMO

As leishmanioses são amplamente distribuídas no mundo e têm grande impacto na saúde pública. O ciclo evolutivo de *Leishmania* envolve mamíferos reservatórios e flebotomíneos vetores que o mantêm em zonas rurais e urbanas. A Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR) é uma técnica com alta especificidade e sensibilidade e tem sido útil para detectar a presença de *Leishmania* em flebotomíneos. O objetivo deste estudo foi investigar a infecção natural por *Leishmania (Viannia)* em flebotomíneos no município de Bandeirantes, estado do Paraná. Para a múltipla-PCR 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 (Viannia)*; e ii) 5Llca e 3Llca, 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 identificadas 737 fêmeas de flebotomíneos, das quais 640 (66 *pools*) que foram submetidos à múltipla-PCR. As espécies identificadas foram *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri*, *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*, *Expapillata firmatoi* e *Brumptomyia firmatoi*. Todos os *pools* apresentaram o fragmento de 220 pb para detecção de DNA de flebotomíneos, porém não se constatou a infecção por *Leishmania* em nenhuma amostra. A múltipla-PCR contendo um controle interno de amplificação tem se mostrado eficiente para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos. Apesar de não ter sido detectada a presença de *Leishmania* nos flebotomíneos analisados, não se pode negar a importância de *Pi. pessoai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Ny. neivai* na epidemiologia da LT, uma vez que estas espécies têm sido assinaladas com infecção natural. A densidade populacional, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a antropofilia, a adaptação nos ambientes antrópicos desses insetos e as condições climáticas são fatores favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania*. Estes fatores põem em evidência 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.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. PCR. *Leishmania*. Flebotomíneos.

## Investigation of natural infection of sand flies by *Leishmania (Viannia)* in southern Brazil

### **ABSTRACT**

Leishmaniasis is widespread in the world and has a significant impact on public health. The life cycle of *Leishmania* involves sand fly vectors and mammalian reservoirs that sustain it in rural and urban areas. The Multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR) is a technique with high specificity and sensitivity that has been useful for detecting the presence of *Leishmania* in sand flies. The objective of this study was to investigate the natural infection of sand flies by *Leishmania* in Bandeirantes Municipality, Paraná State. Two pairs of primers were used for multiplex PCR: i) the MP3H and MP1L to amplify a fragment of 70 pb of the conserved region from the minicircle of the kinetoplast of the subgenus *Leishmania (Viannia)*, and ii) the 5Llca and 3Llca to amplify a fragment of 220 pb from the *IVS6* gene region of the cacophony in insects of the genus *Lutzomyia*, for internal control of the reaction. Were identified 737 sand flies female, of which 640 (66 pools) were tested by multiplex PCR. Were identified specimens of *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri*, *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*, *Expapillata firmatoi* e *Brumptomyia brumpti*. All pools showed the 220 bp fragment for sand flies DNA detection but were not found anyone with *Leishmania* infection. The multiplex PCR containing an internal amplification control has proved effective for detecting *Leishmania* infection in sand flies. Despite not having been detected the presence of *Leishmania* in analyzed sandflies, can not be denied the importance of *Pi. pessoai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* and *Ny. neivai* in LT epidemiology, since these species have been found with natural infection in other studies. The population density, geographic distribution, domicile and peridomicile frequency, anthropophily, adaptation of these insects in anthropic environments and climatic conditions are favorable factors to the persistence of enzootic cycle of *Leishmania*. These factors highlight the need for research on sand flies behavior, including the infection rate, such results can be an indicator of the need for intervention by public health services, triggering measures of these insects' population control.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.;  
BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v.7, p.  
581-596, 2007..... 19

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I ) e da publicação científica (Capítulo II): *Journal of Vector Ecology* , disponível em: < <http://goo.gl/gSuge> >

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	12
1.1	Histórico	12
1.2	Leishmanioses	12
1.3	Epidemiologia	13
1.5	<i>Leishmania</i>	14
1.6	Flebotomíneos	15
1.7	Justificativa	16
1.8	Objetivos	17
1.9	Referências	17
2	CAPÍTULO II	21
2.1	Artigo 1: Investigação de infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania (Viannia)</i> , no sul do Brasil	22
3	CAPÍTULO III	38
3.1	Conclusões	38
3.2	Perspectivas futuras	39

## CAPÍTULO I

### HISTÓRICO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade. Os primeiros relatos desta patologia são datados desde o século I d.C. na Ásia Central, com a descoberta de cerâmicas que mostram figuras humanas com mutilações típicas de leishmaniose mucocutânea em lábios e narinas (BASSANO, CAMARGO, 2004).

No Brasil, a primeira referência de LT encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, onde se relata a viagem do Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga até o Peru e regiões do vale amazônico (BASSANO, CAMARGO, 2004). A existência do botão endêmico dos países quentes chamado “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”, foi identificada por Moreira em 1895 (BRASIL, 2007). No ano de 1909, ocorreu a confirmação de formas de leishmânias em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas com o encontro do parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo, na região de Bauru (BRASIL, 2007). Em 1911 foi diagnosticada a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania brazilienses* (BRASIL, 2007). Em 1922 foi demonstrado o papel do flebotomíneo na transmissão da LT e, em 1958, Forattini encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do estado de São Paulo (BRASIL, 2007).

Até a década de 1940, os casos de LT no Brasil tinham relação com condutas adotadas pelo homem que favoreciam o seu contato com os reservatórios e vetores de *Leishmania*, como o desbravamento de florestas, a derrubada de matas para o plantio, a construção de estradas de rodagem, ferrovias hidrelétricas e estabelecimento de novos povoados (FORATTINI, 1973). Posteriormente os casos de LT vieram a ocorrer em zonas rurais, e urbanas do Brasil (BRASIL, 2007).

No estado do Paraná, os casos de LT têm sido registrados desde o início do século até 1958 (BRASIL, 2007). Após uma lacuna, a doença voltou a ser oficialmente notificada em 1980, mantendo-se endêmica em diversos municípios (TEODORO et al., 1991, 2010).

### LEISHMANIOSES

As leishmanioses têm sido consideradas um grave problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (WHO, 2010). As formas clínicas destas antropozoonoses são: i) a LT,

também conhecida como ferida brava ou úlcera de Bauru, com o desenvolvimento de lesões ulcerativas na pele no local da picada; ii) a leishmaniose cutânea difusa, com múltiplos nódulos não-ulcerativos; iii) a leishmaniose mucosa, com lesões destrutivas na mucosa da nasofaringe; e, iv) a leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave, na qual ocorre a disseminação crônica da infecção para o fígado, baço e a medula óssea, podendo ser fatal se não houver tratamento específico (BRASIL, 2007; REITHINGER et al., 2007; REY, 2008; WHO, 2010).

O parasito causador das leishmanioses é transmitido pela picada de flebotomíneos infectados. No caso da LT, a lesão inicial se dá no local da picada. O período de incubação, no homem, é em média 2 meses (BRASIL, 2007).

Após a cura clínica da LT, de 3 a 5% dos casos evoluem para a forma mucosa, secundárias à lesão cutânea inicial, que se manifesta clinicamente por lesões destrutivas nas vias aéreas superiores (BRASIL, 2007).

## **EPIDEMIOLOGIA**

As leishmanioses estão presentes em 98 países, têm elevada incidência e grande impacto na saúde pública (WHO, 2010; WHO, 2013). Aproximadamente 350 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de infecção, com uma estimativa de 14 milhões de pessoas infectadas e 2 milhões de novos casos anuais (WHO, 2010). A epidemiologia das leishmanioses envolve mamíferos (reservatórios) e flebotomíneos (vetores) em ambientes e climas os mais diversos (WHO, 2010).

O número de casos de LT vem se mantendo elevado na América Latina, especialmente no Brasil (BRASIL, 2011). Entre os anos 1990 a 2011 foram registrados 13.161 casos de LT na região sul do Brasil, dos quais 94,9% foram no estado do Paraná, onde já foi registrada na maioria dos 399 municípios, acometendo ambos os sexos e várias faixas etárias (BRASIL, 2012).

O primeiro caso de LT registrado nos arquivos da Secretaria Municipal de Saúde de Bandeirantes, Paraná foi em quatro de outubro de 1989 (BANDEIRANTES, 2012) e de 1990 a 2013 foram notificados 285 casos autóctones, com ocorrência em todos os anos deste período (BANDEIRANTES, 2013).

A ocorrência de LT em mulheres e crianças no Paraná e a presença marcante de flebotomíneos no peridomicílio e domicílio indicam a tendência desses dípteros estarem adaptando-se aos ambientes antrópicos, onde podem estar transmitindo o agente da doença (TEODORO et al., 1993). Há evidências de que os flebotomíneos vêm encontrando, em locais

como galinheiros, pocilgas, abrigos de cães e de outros animais, ou nas suas proximidades, condições apropriadas para a procriação (TEODORO et al., 1993). Peterson e Shaw (2003) sugeriram que *Ny. whitmani* talvez represente um exemplo notável de alta tolerância de um inseto a mudanças ecológicas drásticas, com sua capacidade de sobreviver e adaptar-se a novos nichos ecológicos. A ação do homem sobre o ambiente pode influenciar a população de flebotomíneos, induzindo o aumento do número desses insetos ou favorecendo o seu controle populacional (REINHOLD-CASTRO et al., 2013).

## LEISHMANIA

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Em seu ciclo de vida, esses protozoários envolvem vertebrados (mamíferos) e invertebrados (flebotomíneos), onde se desenvolvem, respectivamente, em células do sistema mononuclear fagocitário na forma amastigota e no tubo digestório do vetor na forma promastigota (REITHINGER et al., 2007).

No Brasil existem sete espécies de *Leishmania* identificadas como causadoras de LT, as quais pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*:

- *Leishmania (Viannia) braziliensis*: responsável pela grande maioria das lesões; ocasiona lesões cutâneas e mucosas e ocorre em todos os estados do Brasil;
- *Leishmania (Viannia) guyanensis*: ocasiona a forma cutânea, é caracterizada por múltiplas lesões, podendo acometer a mucosa; ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Roraima;
- *Leishmania (Viannia) naiffi*: ocasiona a forma de evolução benigna; ocorre nos estados do Pará e Amazonas;
- *Leishmania (Viannia) shawi*: é responsável por casos esporádicos no Maranhão e Pará;
- *Leishmania (Viannia) lainsoni*: foi descrita no Acre, Pará, Roraima;
- *Leishmania (Viannia) lindenberg*: até o momento foi isolada apenas de casos humanos; presente no Pará;
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: responsável pela forma cutânea e ocasionalmente pela forma cutânea-difusa anérgica; ocorre em diferentes regiões do Brasil, no Norte: Amazônia, 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 (BRASIL, 2007).

## FLEBOTOMÍNEOS

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Os flebotomíneos apresentam período de vida relativamente curto, de duas a quatro semanas (BRASIL, 2007).

A participação de flebotomíneos na epidemiologia da LT é bem conhecida, contudo, as investigações sobre o comportamento das diferentes espécies, devem ser aprofundadas visando o encontro de meios para controlar a população desses dípteros (TEODORO, 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).

No Brasil são relatadas 260 das 480 espécies de flebotomíneos descritos na região Neotropical (SHIMABUKURO, GALATI, 2011). Porém, apenas algumas delas estão envolvidas no ciclo de transmissão de *Leishmania*. As espécies *Migonemyia migonei* (França), *Nyssomyia neivai* (Pinto), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Pintomyia fischeri* (Pinto) e *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto) 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).

Em um estudo realizado no município de Bandeirantes, Massafera et al. (2005) descreveram as espécies *Ny. whitmani*, *Ny. neivai*, *Mi. migonei*, *Pi. fischeri*, *Expapillata firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino), *Pi. pessoai*, *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira), *Brumptomyia brumpti* (Larrousse) e do gênero *Micropygomyia*, lembrando que as duas primeiras espécies de flebotomíneos têm destacado papel na epidemiologia da LT.

É mister a investigação da infecção natural de flebotomíneos em localidades ainda não estudadas. Os estudos de competência vetorial de flebotomíneos têm relação com a capacidade dos parasitos de: i) resistirem à atividade das enzimas digestivas presentes do intestino médio do inseto durante a digestão sanguínea; ii) escaparem da matriz peritrófica que envolve o bolo alimentar; iii) completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, com o desenvolvimento e diferenciação das formas evolutivas e; iv) infectarem o hospedeiro vertebrado através da inoculação (PIMENTA et al., 2003).

Nos estudos relacionados à taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* foram encontrados infectados *Ny. whitmani* (LUZ et al., 2000; NEITZKE-ABREU et al., dados não publicados) e *Ny. neivai* (OLIVEIRA et al., 2011; NEITZKE-ABREU et al., dados não publicados) no estado do Paraná. *Ny. whitmani* também foi detectado com infecção

natural no Ceará (AZEVEDO et al., 1990a) e em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008); *Ny. neivai*, em Santa Catarina (MARCONDES et al., 2009), Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009) e Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2009); *Mi. migonei*, no Ceará (AZEVEDO et al., 1990b), Rio de Janeiro (PITA-PEREIRA et al., 2005) e Pernambuco (CARVALHO et al., 2010); *Pi. fischeri*, no Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2011) e *Pi. pessoai*, em São Paulo (FORATTINI et al., 1972).

Atualmente uma série de estudos na área da biologia molecular tem sido desenvolvida em busca de novas ferramentas para o diagnóstico de *Leishmania*. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que tem alta sensibilidade e especificidade, pode ser empregada também para a detecção da taxa de infecção em flebotomíneos (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1999).

Os flebotomíneos possuem em seus tecidos prováveis interferentes que podem diminuir a eficiência da PCR através da inibição da *Taq* DNA Polimerase (HIGGINS et al., 1995; SIRIDEWA et al., 1996). Assim, a técnica de Múltipla-PCR utiliza, além de iniciadores para detecção de *Leishmania*, um par de iniciadores para detecção de DNA de flebotomíneos, o qual funciona como um controle interno da reação (OLIVEIRA et al., 2011).

## **JUSTIFICATIVA**

A participação de flebotomíneos na epidemiologia da LT é bem conhecida, contudo, as investigações sobre a competência vetorial de flebotomíneos, sobretudo das envolvidas no ciclo de transmissão nos ambientes antrópicos, devem ser aprofundadas visando conhecer a vulnerabilidade da endemia.

Ainda é pequeno o número de localidades no estado do Paraná em que foram realizados estudos sobre a competência vetorial de flebotomíneos e isto justifica a realização de pesquisas que avaliem a taxa de infecção desses insetos. O conhecimento da taxa de infecção de vetores naturalmente infectados em áreas onde há casos de LT e a identificação mais precisa e rápida do agente etiológico são indicadores importantes da necessidade da intervenção dos serviços de saúde pública para o desencadeamento de medidas de controle da população desses insetos. Cabe lembrar que o conhecimento e a tipificação do agente etiológico em áreas endêmicas de LT contribuem para que o tratamento seja mais eficaz.

## OBJETIVOS

### GERAL

Investigar a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* no município de Bandeirantes, estado do Paraná utilizando a técnica da múltipla-PCR.

### ESPECÍFICOS

Identificar a fauna de flebotomíneos em área rural do município de Bandeirantes, estado do Paraná.

Verificar as espécies de flebotomíneos mais frequentes.

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

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A.C.R.; RANGEL, E.F.; COSTA, E.M.; DAVID, J.; VASCONCELOS, A.W.; LOPES, U.G. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará state, northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, p. 251, 1990a.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) Naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p.479, 1990b.

BANDEIRANTES, Secretaria Municipal de Saúde, 2012. Arquivos de registros internos.

BASSANO, S.A.; 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. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p. Disponível em: <http://goo.gl/mPcbz>. (Acessado em 04/04/2012).

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. 2012. Disponível em: <http://goo.gl/ijNPy>. (Acessado em 12/02/2013).

CARVALHO, G. M. L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; LIMA, A. C.V.M. R.; GONTIJO C. M.F. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diases**, v. 8, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, M.R.; VALENÇA, H.F.; SILVA, F.J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T.A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P.; BRANDÃO FILHO, S.P. *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, p. 108-110, 2010.

FORATTINI, O.P. Leishmanioses Tegumentares Americanas (LTA). In: FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. Edgard Blucher/EDUSP, 1973. p. 570-610.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.G.B; RABELLO, E.X; FERREIRA, A.O. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de Leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v. 6, p. 431-33, 1972.

HIGGINS, J.A.; AZARD, A.F. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. **Journal Medical Entomology**, v. 32, p. 213-222, 1995

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E.A.; DEREURE, J.; PRATLONG, J.; DEDET, A.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V). braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p. 623-631, 2000.

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

MASSAFERA, R.; SILVA, A.M.; CARVALHO, A.P.; SANTOS, D.R.; GALATI, E.A.B.; TEODORO, U. Fauna de Flebotomíneos do município de Bandeirantes, no estado do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 571-577, 2005.

MEDEIROS, A.C.L.; ROSELINO, A.M.F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 74, p. 327-336, 1999.

MELO, S.C.C.S. Fauna e freqüência 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.

OLIVEIRA, D.M.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; BERNAL, M.V.Z.; LEGRIFTON, C.M.O.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, p.137-143, 2011.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**,v. 33, p. 919-931, 2003.

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; BLANCO, E.E.N.; Interação vetor-hospedeiro. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R.; (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 275-289, 2003.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.R.; SOUZA, M.B.; BRAZIL, R.P.; BERTHO, A.L.; BARBOSA, A.F.; BRITTO, C.C.. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil)

revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 905-913, 2005

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G.D.; ZWETSCH, A.; ALVES, C.R.; BRITTO, C.; RANGEL, E.F. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 80, p.593-595, 2009.

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

REINHOLD-CASTRO, K.R.; FENELON, V.C.; ROSSI, R.M.; BRITO, J.E.C.; FREITAS, J.S.; TEODORO, U. Impact of control measures and dynamics of sand flies in southern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, 2013, no prelo.

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.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, p. 581-596, 2007.

REY, L. O Complexo “*Leishmania braziliensis*” e as Leishmaníases Tegumentares Americanas: Leishmaníase por *Leishmania braziliensis*. In: REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 372-383, 2008.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS, M.A.; BARKER, D.C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 47-49, 1999.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G.M.L.; GONTIJO, C.M.F.; QUARESMA, P.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FALCÃO, A.L.; ANDRADE FILHO, J.D. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1159-1163, 2009.

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.; DE CAMARGO, N.J.; DOS SANTOS D.R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A.C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E.C.; KONOLSAISEN, J.F.; ISETTO JR, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E.A.B. Diversity, distribution and abundance of sand-

flies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v.3, p. 209-25, 2008.

SIRIDEWA, K.; KARUNANAYAK, E.H.; CHANDRASEKHARAN, N.V. Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples hydrocele fluid, and mosquito vector. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 54, p.72-76, 1996.

TEODORO, U.; LA SALVIA FILHO, 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**, vol. 25, p. 129-133, 1991.

TEODORO, U.; SALVIA FILHO, L.V.; LIMA, E.M.; SPINOSA, R.P.; BARBOSA, O.C.; FERREIRA, M.E.M.C.; SILVEIRA, T.G.V. Flebotomíneos em áreas de transmissão de leishmaniose tegumentar na Região Norte do estado do Paraná – Brasil: Variação sazonal e atividade noturna. **Revista Saúde Pública**, v. 27, p. 190-194, 1993.

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 Saúde Pública**, v. 31: 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. Preliminary information on sandflies in the north of Paraná state, Brazil. **Revista 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 de Patologia Tropical**, v. 39: p. 322-330, 2010.

WHO. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. 2010. Disponível em: <http://goo.gl/1WxXs> (Acessado em 12/09/2012).

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

## CAPÍTULO II

**Artigo 1: “INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
POR *LEISHMANIA (VIANNIA)*, NO SUL DO BRASIL”**

**INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR  
*LEISHMANIA (VIANNIA)*, NO SUL DO BRASIL**

Thaís R. Ranucci, Kárin R. Reinhold-Castro, Herintha C. Neitzke-Abreu, Jaqueline de C. Gasparotto, Barbara A. dos Santos, Thais G. V. Silveira e Ueslei Teodoro

Programa 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

RESUMO: As leishmanioses têm ampla distribuição mundial, com grande impacto na saúde pública. O objetivo deste estudo foi investigar a infecção natural por *Leishmania (Viannia)* em flebotomíneos no município de Bandeirantes, estado do Paraná. Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas de Shannon, no Bairro Água do Cateto, município de Bandeirantes, estado do Paraná, sul do Brasil. Para verificar a infecção natural desses insetos foi utilizada a Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR), que é uma técnica com alta especificidade e sensibilidade e tem sido útil para detectar a presença de *Leishmania* em flebotomíneos. Foram coletados 1.297 flebotomíneos, 737 fêmeas e 560 machos, das espécies *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri*, *Nyssomyia neivai*, *Expapillata firmatoi* e *Brumptomyia brumpti*. Foram submetidas à múltipla-PCR 640 fêmeas em 66 *pools* das quatro primeiras espécies citadas. Não se constatou a presença de *Leishmania (Viannia)* em nenhum dos *pools*, entretanto não se pode negar a importância destas espécies na epidemiologia da leishmaniose tegumentar, uma vez que estas espécies têm sido assinaladas com infecção natural. A densidade populacional, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a antropofilia adaptação nos ambientes antrópicos desses insetos e as condições climáticas são fatores favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania*. Estes fatores evidenciam a necessidade de investigações sobre o comportamento de flebotomíneos, incluindo a taxa de infecção, cujos resultados podem indicar a necessidade da intervenção dos serviços de saúde pública para o desencadeamento de medidas de controle da população desses insetos.

Palavras-chave: Leishmaniose, PCR, *Leishmania*, flebotomíneos

## Introdução

A distribuição das leishmanioses em 98 países, o impacto na saúde pública e a elevada incidência incluem essas doenças entre as mais importantes endemias do mundo (WHO 2010, WHO 2013). Daí a relevância da realização de estudos sobre o comportamento de flebotomíneos e outros fatores relacionados à epidemiologia dessas doenças. A verificação da taxa de infecção de flebotomíneos por *Leishmania* têm importância na validação das espécies desses insetos envolvidas na epidemiologia das leishmanioses. De aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos registradas no mundo, 480 são da Região Neotropical, das quais 260 ocorrem no Brasil (Shimabukuro & Galati, 2011). As espécies *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Nyssomyia neivai* (Pinto), *Migonemyia migonei* (França), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto) e *Pintomyia fischeri* (Pinto) têm destacada importância na

transmissão de patógenos que causam a leishmaniose tegumentar (LT) e têm sido frequentemente coletadas no estado do Paraná (Teodoro et al. 2010).

Os métodos moleculares têm se mostrado eficientes para detecção de *Leishmania* em flebotomíneos (Kato et al. 2005, Michalsky et al. 2002) e uma dessas ferramentas é a técnica da Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (múltipla-PCR), que apresenta alta especificidade e sensibilidade (Perez et al. 1994, Rodríguez et al. 1994). A taxa de infecção de vetores naturalmente infectados por *Leishmania* e a identificação mais precisa do agente etiológico têm grande importância na epidemiologia das leishmanioses (Michalsky et al. 2002) e pode ser útil na prevenção destas doenças (Kato et al. 2005).

Nos estudos relacionados à taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* foram encontrados infectados *Ny. whitmani* (Luz et al. 2000, Neitzke-Abreu et al. dados não publicados) e *Ny. neivai* (Oliveira et al. 2011, Neitzke-Abreu et al. dados não publicados) no estado do Paraná. *Ny. whitmani* também foi detectado com infecção natural no Ceará (Azevedo et al. 1990a) e em Minas Gerais (Carvalho et al. 2008); *Ny. neivai*, em Santa Catarina (Marcondes et al. 2009), Minas Gerais (Saraiva et al. 2009) e Rio Grande do Sul (Pita-Pereira et al. 2009); *Mi. migonei*, no Ceará (Azevedo et al. 1990b), Rio de Janeiro (Pita-Pereira et al. 2005) e Pernambuco (Carvalho et al. 2010); *Pi. fischeri*, no Rio Grande do Sul (Pita-Pereira et al. 2011) e *Pi. pessoai*, em São Paulo (Forattini et al. 1972).

Há necessidade de novos estudos de investigações da infecção natural de flebotomíneos no Paraná, onde a LT é endêmica e o número de trabalhos abordando esse assunto é reduzido. O registro de 285 casos de LT no município de Bandeirantes, em todos os anos do período de 1990 a 2013 (Bandeirantes 2013), denota que neste município há localidades com características ambientais que mantêm ativo o ciclo de *Leishmania* e carecem, portanto, de maiores cuidados do serviço de vigilância local. Desta forma, a determinação da taxa de infecção natural de flebotomíneos em localidades onde tem ocorrido casos no município de Bandeirantes é um dado importante para a compreensão da epidemiologia da LT, podendo sugerir o desencadeamento de medidas de controle da população desses insetos.

## **Materiais e Métodos**

As coletas de flebotomíneos foram realizadas no município de Bandeirantes (50°25' e 50°20' Longitude Oeste e 23°07' e 23°05' Latitude Sul), localizado na mesorregião Norte Pioneiro Paranaense. O município de Bandeirantes possui uma área territorial de 44.527,9 hectares, com uma população de 32.182 habitantes, dos quais 28.382 são moradores da área

urbana e 3.800 da área rural (IBGE 2010). Este município está inserido no pólo Cinzas-Laranjinha de produção de leishmaniose, que é parte do circuito de produção Paraná-Paranapanema (Monteiro et al. 2009). A área rural de Bandeirantes, segundo a divisão administrativa da prefeitura municipal, é dividida em 16 bairros (Figura 1). As coletas foram desenvolvidas em mata da zona rural do bairro Água do Cateto, na Fazenda Cateto Nomura. A área estudada encontrava-se desabitada no período das coletas, bem como foi alterado o tipo de cultivo do local. A mata é do tipo densa tropical de transição para subtropical, com queda parcial de folhas de algumas espécies arbóreas no inverno, quando ocorre seca pouco pronunciada.

Os flebotomíneos foram coletados em armadilha de Shannon, com tubo de ensaio contendo algodão embebido em clorofórmio e aspirador de Castro, por dois ou mais coletores, das 18h30min às 00h30min ou 2h30min, somando 46 horas, nos meses de Março, Abril, Maio, Agosto e Setembro de 2012. Os insetos coletados foram sacrificados com clorofórmio. Logo após a coleta, os flebotomíneos foram acondicionados em frascos contendo isopropanol para conservação e posterior identificação das espécies (Paiva et al. 2007). 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, na porção final do abdômen foram feitos pequenos cortes para a exposição da espermateca. 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 tubos *ependorf*, em *pools* com 7 a 10 espécimes, da mesma espécie, contendo isopropanol, para posterior extração do DNA.

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 (50mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8,0, 50mM Tris-HCL pH 7,4, Triton X100 1% e 10mM DTT) e para a extração foi utilizada solução de isotiocianato de guanidina e fenol. O DNA foi ressuspendido em 20 µL de H<sub>2</sub>O destilada e estocado a 4°C até o uso. Para cada 22 amostras extraídas foi utilizado um controle positivo [machos de flebotomíneos acrescido de 10<sup>5</sup> 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 amplificaram fragmento de 70 pb da região conservada do minicírculo do cinetoplasto

(kDNA) do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) (Lopez et al. 1993); e os iniciadores 5Ll<sub>ca</sub>c (5'-GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG-3') e 3Ll<sub>ca</sub>c (5'-CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC-3') que amplificaram 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<sub>2</sub>, 1X Tampão de enzima e 2µL de DNA. A amplificação foi realizada em Termocicladora PC (Biometra, Alemanha) a 94°C por 7 min, seguido por 30 ciclos (1,5min a 95°C; 1,5min a 57°C; 2min a 72°C) (Oliveira et al. 2011). A extensão foi continuada por mais 10 min a 72°C e os tubos foram mantidos a 4°C até a análise. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), corado pelo brometo de etídeo 0,1 µg/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 1.297 flebotomíneos, dos quais 737 fêmeas e 560 machos. Coletaram-se 660 exemplares de *Pi. pessoai*, 334 de *Ny. whitmani*, 201 de *Pi. fischeri*, 50 de *Ny. neivai*, 46 de *Mi. migonei*, 5 de *Ex. firmatoi* e 1 de *Br. brumpti* (Tabela 1)

Um total de 640 fêmeas de flebotomíneos (66 *pools*) foram submetidos à múltipla-PCR. A banda de 220 pb do gene da cacofonia em flebotomíneos foi detectada em todos os *pools*, indicando ausência de inibidores da *Taq* DNA Polimerase (Figura 2). Os resultados mostraram a ausência de *Leishmania* (*Viannia*) em todas as amostras (Tabela 2).

## Discussão

As espécies de flebotomíneos coletados foram relatadas anteriormente no estado do Paraná (Membrive et al. 2004, Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2010). As fêmeas representam 56,8% do total de flebotomíneos coletados. Houve predomínio de *Pi. pessoai* (50,9%) seguido da espécie *Ny. whitmani* (25,7%). Anteriormente, em Bandeirantes, Massafera et al (2005) verificaram o predomínio de *Ny. whitmani* seguida de *Ny. neivai*. Melo (2009), no mesmo município, observou o predomínio ora de *Ny. whitmani* ora de *Ny. neivai*, conforme a localidade de coleta.

Em 2008 havia na Fazenda Cateto Nomura quatro habitantes, criação de galinhas e porcos, além de culturas de soja, café e algumas árvores frutíferas (Melo, 2009). No período de realização deste trabalho as culturas referidas foram substituídas pela cana-de-açúcar, as residências foram demolidas e os habitantes dispensados. Estas alterações, a ausência dos habitantes e animais domésticos, podem ter acarretado a mudança no predomínio das espécies de flebotomíneos. Este fato já foi observado nos municípios de Terra Boa (Teodoro et al. 1993) e Lobato (Teodoro et al. 2006), ambos no Paraná, onde foram realizadas coletas de flebotomíneos.

Do total de 640 fêmeas de flebotomíneos submetidas à múltipla-PCR não se constatou a infecção natural em nenhuma das espécies. Inúmeras investigações têm demonstrado que as taxas de infecção destes insetos são variáveis. Os trabalhos referentes à infecção natural de flebotomíneos mostram que o número desses 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). Com a técnica da PCR, Carvalho et al. (2008) encontraram 0,83% de 120 fêmeas de *Ny. whitmani* com infecção por *Leishmania*, enquanto Neitzke-Abreu et al. (dados não publicados) detectaram 1,12% em 268 fêmeas. Em *Ny. neivai* a taxa de infecção foi de 9,1% em 440 fêmeas, segundo Córdoba-Lánus et al. 2006; 13,1% em 562 fêmeas, segundo Marcondes et al. 2009; 1,11% em 270 fêmeas, conforme Pita-Pereira et al. 2009; 0,23% em 1.755 fêmeas, conforme Oliveira et al. 2011; e 0,46% em 216 fêmeas, segundo Neitzke-Abreu et al. (dados não publicados). Pita-Pereira et al. (2011) encontraram taxa de infecção de 0,38% em 520 fêmeas de *Pi. fischeri*.

Pela técnica de dissecação nota-se que a taxa de infecção de flebotomíneos tem sido baixa. Em *Ny. whitmani*, Azevedo et al. (1990a) encontraram taxa de infecção de 0,8% em 893 fêmeas; Luz et al. (2000) detectaram 0,18% em 1.628 fêmeas e Galati et al. (1996) verificaram 0,16% em 613 fêmeas. Contudo, há diversos trabalhos que mostram taxas de infecção zero por PCR ou dissecação, mesmo em áreas onde tem sido notificados casos de LT (Castro et al. 2005, Feitosa & Castellón 2004, Neitzke et al. 2008, Scodro et al. 2008, Silva & Gomes, 2001).

As técnicas moleculares para pesquisa de DNA são ferramentas importantes para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos, tendo como principais vantagens a sensibilidade e a 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 & Azard, 1995, Siridewa et al. 1996).

Apesar de não ter sido detectada a presença de *Leishmania* nos flebotomíneos analisados, não se pode negar a importância de *Pi. pessoai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Ny. neivai* na epidemiologia da LT, uma vez que estas espécies têm sido assinaladas com infecção natural. A densidade populacional desses insetos, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a antropofilia, a adaptação nos ambientes antrópicos e as condições climáticas são fatores favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania*. Estes fatores põem em evidência 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.

### **Agradecimentos**

Aos proprietários e ao administrador da Fazenda Cateto Nomura por terem permitido as coletas de flebotomíneos. Aos guardas de endemias do Serviço de Vigilância da Saúde do Ministério da Saúde, sediados em Jacarezinho, no Núcleo de Entomologia da 19ª Regional de Saúde do Paraná, Rubens Massafra, Valdecir Aparecido Fagundes, Clovis Spiacci Pereira, José Carlos Lavorato, Helio Aparecido Barbosa e Nivaldo Paulino; ao Reinaldo Marqui, da Secretaria Municipal de Saúde de Bandeirantes, pelo auxílio na captura dos flebotomíneos.

### **Referências**

- Azevedo, A.C.R., E.F. Rangel, E.M. Costa, J. David, A.W. Vasconcelos, and U.G. Lopes. 1990a. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará state, northeast Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85: 251.
- Azevedo, A. C. R. Rangel, E. F. Queiroz, R. G. Lutzomyia migonei (França, 1920) Naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. 1990b. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:479.
- Bandeirantes, Secretaria Municipal de Saúde, 2012. Arquivos de registros internos.
- Carvalho, G.M.L., J.D.F. Andrade, A.L. Falcão, A.C.V.M.R. Lima, and C.M.F. Gontijo. 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 8: 407-414.

- Carvalho, M.R. Valença, H.F. Silva, F.J. Pita-Pereira, D. Pereira, T.A. Britto, C. Brazil, R.P. Brandão Filho, S.P. *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. 2010. *Acta Trop.* 116:108-110,
- Castro, E.A., E. Luz, F.Q. Telles, A. Pandey, A. Biseto, M. Dinaiski, I. Sbalqueiro, and V.T. Socol. 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* 93: 141-149.
- 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.
- Feitosa, M.A.C. and E.G. Castellón. 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amaz.* 34: 121-127.
- Feliciangeli, M.D. Reyes, R.M. Limongi, J.E. Natural infection of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous Leishmaniasis in northern Venezuela. 1988 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83:393-394
- Forattini, O.P. Pattoli, D.G.B. Rabello, E.X. Ferreira, A.O. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de Leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. 1972. *Rev. Saúde Pública.* 6:431-33.
- Galati, E.A.B., V.L.B. Nunes, M.E.C. Dorval, E.T. Oshiro, G. Cristaldo, M.A. Espíndola, H.C. Rocha, and W.B. Garcia. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 30: 115-128.
- Galati, E.A.B. 2003. Morfologia e Taxonomia. In: E.F. Rangel, and R. Lainson (eds) pp. 23-206. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz.
- Higgins, J.A. Azard, A.F. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. 1995. *J. Med. Entomol.* 32:213-222.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. <http://www.ibge.com.br/cidadesat/topwindow.htm?1> Acessado em 25 de março de 2011.
- 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.
- Lins, R.M., S.G. Oliveira, N.A. Souza, R.G. de Queiroz, S.C. Justiniano, R.D. Ward, C.P. Kvarciacou, 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.
- Luz, E., N. Membrive, E.A. Castro, J. Dereure, F. Pratlong, J.A. Dedet, A. Pandey, and V. Thomaz-Soccol. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 623-631.
- Massafera, R., A.M. da Silva, A.P. de Carvalho, D.R. dos Santos, E.A.B. Galati and U. Teodoro. 2005. Fauna de Flebotomíneos do município de Bandeirantes, no estado do Paraná. *Rev. Saúde Pública.* 39: 571-577.
- 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.
- Melo, S.C.C.S. 2009. 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, Brasil.
- Membrive, N.A., G. Rodrigues, U. Membrive, W.M. Monteiro, H.C. Neitzke, M.V.C. Lonardon, T.G.V. Silveira, and U. Teodoro. 2004. Sandflies of municipalities in north of Paraná state, south of Brazil. *Entomol. Vect.* 11: 673-680.
- Michalsky, É.M., C.L. Fortes-Dias, P.F.P. Pimenta, N.F.C. Secundino, and 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, and 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, H.C., R.B.L. Scodro, K.R. Reinhold-Castro, A.C. Dias, T.G.V. Silveira, and U. Teodoro. 2008. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41: 17–22.
- 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.
- Paiva, B.R., N.F.C. Secundino, P.F.P. Pimenta, E.A.B. Galati, et al. 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad. Saúde Pública. 23:87-94.
- Pimenta, P.F.P. Secundino, N.F.C. Blanco, E.E.N. Interação vetor-hospedeiro. In: Rangel, E. F, Lainson, R.; (Org.). Flebotomíneos do Brasil. 2003. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 275-289.
- 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.
- Pita-Pereira, D., C.R. Alves, M.B. Souza, R.P. Brazil, A.L. Bertho, A. de F. Barbosa, C.C. Britto. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 99: 905-913.
- 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.
- Pita-Pereira, D., G.D. Souza, T.A. Pereira, A. Zwetsch, C. Britto, and E.F. Rangel. 2011. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by

- Leishmania (Viannia)* DNA in a specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta Tropica*, 120:273-275.
- 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
- Saraiva, L., G.M.L. Carvalho, C.M.F. Gontijo, P.F. Quaresma, A.C.V.M.R. Lima, A.L. Falcão, and J.D. Andrade Filho. 2009. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J. Med. Entomol.* 46:1159-1163.
- Scodro, R.B.L., K.R. Reinhold-Castro, A.C. Dias-Sversutti, H.C. Neitzke-Abreu, N.A. Membrive, J.B Kühl, T.G.V. Silveira, and U. Teodoro. 2008. Investigation of natural infection by *Leishmania* in Sandflies of Paraná State, Southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51: 483-491.
- 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.C. and A.C. Gomes. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34: 187-191.
- Silva, A.M., N.J. Camargo, D.R. Santos, R. Massafra, A.C. Ferreira, C. Postai, E.C. Cristóvão, J.F Konolsaisen, A. Bisetto Jr., R. Perinazo, U. Teodoro, and E.A.B. Galati. 2008. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 37: 209-225.
- Siridewa, K. Karunanaya, E.H. Chandrasekharan, N.V. Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples hydrocele fluid, and mosquito vector. 1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:72-76.
- Teodoro, U, V.L. Salvia Filho, E.M. Lima, R.P. Spinosa, O.C. Barbosa, M.E.M.C. Ferreira, and T.G.V. Silveira. 1993. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado de Paraná - Brasil: Variação Sazonal e Noturna. *Rev. Saúde Pública.* 27: 190-194.
- 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, and T.G.V. Silveira. 2006. Preliminary information on sandflies in the north of Paraná state, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 40: 327-330.

Teodoro, U., D.R. Santos, A.M. Silva, R. Massafera, L.E. Imazu, W.M. Monteiro, and H.C. Neitzke-Abreu. 2010. Sandfly fauna in counties of the pioneer north of Paraná state, Brazil. *Rev. Patol. Trop.* 39: 322-330.

World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. 2010 <http://goo.gl/1WxXs>  
Acessado em 12/09/2012.

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



Figura 1. Área do Bairro Água do Cateto, onde se localiza a Fazenda Cateto Nomura e foram coletados os flebotomíneos, no município de Bandeirantes, estado do Paraná, sul do Brasil

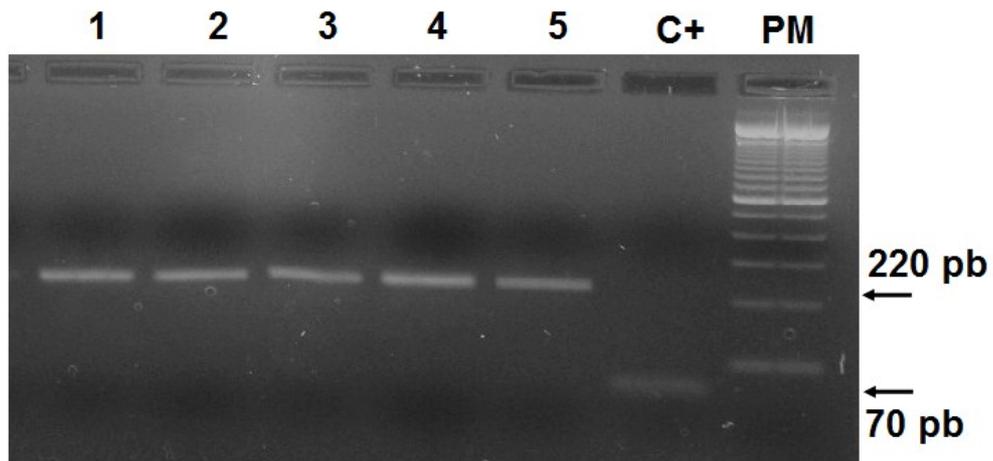


Figura 2. Multiplex-PCR mostrando os fragmentos de 70 pb [da região do minicírculo do k-DNA do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) amplificado com os iniciadores MP3H e MP1L] e 220 pb (da região do gene *IVS6* da cacofonia de insetos do gênero *Lutzomyia* amplificado com os iniciadores 5Llcac e 3Llcac). Raias 1, 2, 3, 4 e 5: amostras negativas de *pools* de flebotomíneos; C+: controle positivo da amplificação [DNA de promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*]; PM: Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®, USA).

Tabela 1. Total de flebotomíneos coletados no bairro Água do Cateto, município de Bandeirantes, estado do Paraná, sul do Brasil, de abril a setembro de 2012

Data Espécie	04/3		16/4		18/4		23/4		16/5		23/8		30/8		20/9		Total		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Expapillata firmatoi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0
<i>Migonemyia migonei</i>	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	7	0	46	0
<i>Nyssomyia neivai</i>	9	4	2	0	0	0	4	3	2	0	12	0	0	0	7	7	36	14	14
<i>Nyssomyia whitmani</i>	140	21	14	6	0	0	14	0	20	8	59	8	0	4	26	14	273	61	61
<i>Pintomyia fischeri</i>	50	5	9	0	0	0	8	0	9	1	103	9	0	2	0	5	179	22	22
<i>Pintomyia pessoai</i>	63	37	29	100	6	6	48	72	16	25	29	3	4	1	49	172	244	416	416
Total	262	73	54	106	6	6	74	75	47	34	203	53	9	8	82	205	737	560	560

♀=machos, ♂=fêmeas

Tabela 2. Fêmeas de flebotomíneos submetidas à técnica de múltipla-PCR, coletadas no bairro Água do Cateto, município de Bandeirantes, Paraná, sul do Brasil, de março a setembro de 2012

Mês Espécie	Março		Abril		Maio		Agosto		Setembro		Total	
	NE	NP	NE	NP	NE	NP	NE	NP	NE	NP	NE	NP
<i>Nyssomyia neivai</i>	9	1	10	1	0	0	10	1	7	1	36	4
<i>Nyssomyia whitmani</i>	140	14	20	2	20	2	40	4	0	0	220	22
<i>Pintomyia fischeri</i>	50	5	17	2	9	1	100	10	0	0	176	18
<i>Pintomyia pessoai</i>	60	6	83	9	16	2	29	3	20	2	208	22
<b>Total</b>	<b>259</b>	<b>26</b>	<b>130</b>	<b>14</b>	<b>45</b>	<b>5</b>	<b>179</b>	<b>18</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>640</b>	<b>66</b>

NE=número de espécimes, NP=número de *pools*

### CAPÍTULO III

#### CONCLUSÕES

Dentre as seis espécies de flebotomíneos coletadas e já descritas no município de Bandeirantes, verificou-se que a proporção das espécies diferiu em relação aos trabalhos realizados anteriormente.

Apesar de não ter sido detectada a infecção natural em nenhuma das espécies de flebotomíneos investigadas deve-se considerar que a densidade populacional, a distribuição geográfica, a frequência no peridomicílio e domicílio, a adaptação nos ambientes antrópicos e as condições climáticas favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania*, são fatores que põem em evidência a importância das espécies *Pi. pessoai*, *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri* e *Ny. neivai* na epidemiologia da LT, uma vez que estas espécies foram constatadas naturalmente infectadas em diferentes regiões do Brasil.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

O fato de não ter sido detectada a infecção natural de flebotomíneos, não significa que a verificação desta taxa, normalmente baixa, deixe de ser uma informação importante para os serviços de vigilância nas áreas onde a LT é endêmica. Daí a necessidade da criação de um 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.