

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

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Multiplex-PCR para pesquisa de *Leishmania* em *Nyssomyia neivai* (Pinto), espécie dominante nas ilhas do Rio Paraná, sul do Brasil

Maringá  
2018

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Multiplex-PCR para pesquisa de *Leishmania* em *Nyssomyia neivai* (Pinto), espécie dominante nas ilhas do Rio Paraná, sul do Brasil

Tese 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 Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ueslei Teodoro

Maringá  
2018

# FOLHA DE APROVAÇÃO

BARBARA ANDREO DOS SANTOS

Multiplex-PCR para pesquisa de *Leishmania* em *Nyssomyia neivai* (Pinto), espécie dominante nas ilhas do Rio Paraná, sul do Brasil

Tese 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 Doutor em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros.

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Ueslei Teodoro  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Alessi Aristides  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Galhardo Demarchi  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Jorge Juarez Vieira Teixeira  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Herintha Coeto Neitzke Abreu  
Universidade Federal da Grande Dourados

Aprovada em: 04 de junho de 2018.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* 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 pessoas que foram essenciais para a concretização deste trabalho; aos meus pais Onélia Aparecida Bassoli Andreo e Osvaldo Alves dos Santos, pelo amor incondicional e por me ensinarem os principais valores humanos; ao meu esposo Marcelo Torres Liberati, que está sempre ao meu lado, incentivando meu crescimento pessoal e acadêmico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em minha vida em todos os momentos me dando força e coragem durante essa longa caminhada.

Aos meus pais, Onélia Aparecida Bassoli Andreo e Osvaldo Alves dos Santos, pelo incentivo, apoio e compreensão, e aos meus irmãos, Mariana Andreo dos Santos e Rodrigo Andreo dos Santos, que são exemplos em minha vida.

Ao meu esposo, Marcelo Torres Liberati, por toda sua dedicação, paciência e confiança. Meu alicerce, que me conforta, apoia e incentiva. Está presente em todos os momentos que mais preciso de sua ajuda e, que sempre fará parte da minha vitória.

Aos meus sogros, Maria Elaine Cilião Torres Liberati e Paulo Cesar dos Santos Liberati, e a minha cunhada, Ana Paula Torres Liberati, que nunca hesitaram em me apoiar nessa jornada sempre com muito carinho e amor.

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

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

A todas as minhas amigas, especialmente à amiga Kárin Rosi Reinhold-Castro que nunca mediu esforços para colaborar na pesquisa, pois sem ela esta pesquisa não teria sido concluída. Você 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.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, especialmente à secretária Olívia Abeche por todas as orientações, gentileza e paciência com que me trataram.

Ao José Luiz Filho, Valmir Ortiz da Silva e José do Porto dos Santos, do Núcleo de Entomologia de Porto Rico (14<sup>a</sup> Regional de Saúde) pelo auxílio imprescindível nas coletas e identificação dos flebotomíneos.

Aos moradores das ilhas de Porto Rico, por terem sido 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 doutorado.

## EPÍGRAFE

A cada dia que vivo, me  
convenço de que o desperdício da  
vida está no amor que não damos,  
nas forças que não usamos, na  
prudência egoísta que nada  
arrisca e que, esquivando-nos do  
sofrimento, perdemos também a  
felicidade.

(Carlos Drummond de Andrade)

Multiplex-PCR para pesquisa de *Leishmania* em *Nyssomyia neivai* (Pinto), espécie dominante nas ilhas do Rio Paraná, sul do Brasil

## RESUMO

As leishmanioses têm grande importância em saúde pública por se tratar de um complexo de doenças com diferentes formas clínicas e epidemiológicas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos por fêmeas de flebotomíneos. A técnica da múltipla reação em cadeia da polimerase (multiplex-PCR) tem sido usada no diagnóstico da leishmaniose e para verificar as taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. Assim, os objetivos deste estudo foram conhecer a fauna e o comportamento de flebotomíneos, e padronizar a multiplex-PCR para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneo de ilhas do Rio Paraná, noroeste do estado do Paraná, Brasil. Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas de Falcão, em dez ilhas: Bandeira, Carioca, Fina, Mutum, Japonesa, São José Catarino, Santa Rosa, Floresta, Chapéu Velho e Cruzeiro, de novembro de 2012 a novembro de 2014. Os flebotomíneos coletados foram identificados e armazenados em tubos com isopropanol, em *pools* de 10 fêmeas, para posterior extração do DNA. Os insetos foram macerados em um tampão de lise e a extração foi realizada com Chelex<sup>®</sup> 100 Resin. Dois pares de primers foram usados na multiplex-PCR. O primeiro par foi A1 e A2, que amplifica o fragmento de 120 pb da região conservada do minicírculo do kinetoplasto (kDNA) do gênero *Leishmania*. O segundo par de primers foi 5Llcaac e 3Llcaac que amplifica um fragmento de 220 pb da região do gene *IVS6* da cacofonia em insetos do gênero *Lutzomyia*. Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese de gel de agarose. *Ny. neivai* foi a única espécie coletada. Um total de 3.870 (387 *pools*) fêmeas de *Ny. neivai* foi submetido à multiplex-PCR. Os resultados da multiplex-PCR para detecção de *Leishmania* em flebotomíneos foram negativos. Portanto, a padronização da multiplex-PCR permitiu a determinação da taxa de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* em uma única reação. Além disso, a multiplex-PCR pode ser usada quando há grande número de flebotomíneos a ser analisado, como nesta pesquisa. Apesar de não ter sido detectada a infecção natural de *Ny. neivai* por *Leishmania*, vale destacar que anteriormente, na ilha Mutum, este flebotomíneo foi detectado com infecção natural por *Leishmania* (*Viannia*), demonstrando a importância deste inseto na epidemiologia da leishmaniose cutânea.



**Palavras-chave:** Flebotomíneos, Leishmaniose tegumentar, Multiplex-PCR, *Leishmania*.

Multiplex-PCR para pesquisa de *Leishmania* em *Nyssomyia neivai* (Pinto), espécie dominante nas ilhas do Rio Paraná, sul do Brasil

### ***ABSTRACT***

Leishmaniasis is of great importance in public health because it is a complex of diseases with different clinical and epidemiological forms, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by females of sandflies. Multiplex Polymerase chain reaction technique (multiplex PCR) has been used to the diagnosis of leishmaniasis and to verify the rates of natural infection of sandflies by *Leishmania*. Thus, the objectives of this study were to identify the fauna, the behavior of sandflies and standardization of the multiplex PCR reaction for the detection of *Leishmania*, in those insects in the islands of the Paraná River, Northwest of the state of Paraná, Brazil. Sandflies were collected with Falcão traps in ten islands: Bandeira, Carioca, Fina, Mutum, Japonesa, São José Catarino, Santa Rosa, Floresta, Chapéu Velho and Cruzeiro, from November 2012 to November 2014. Sandflies were attracted and placed in tubes with isopropanol, in pools of 10 females, for later extraction of the DNA. Insects were then added in a buffer, and the extraction was performed with Chelex® 100 Resin. Two pairs of primers were used in multiplex PCR. The first pair was A1 and A2, which amplify a fragment of 120 bp region the minicircle kinetoplast (kDNA) of the genus *Leishmania*. The second pair of primers was 5Llcac and 3Llcac, that amplify a fragment of 220 bp region the cacophony gene *IVS6* in insects of the genus *Lutzomyia*. The amplified results were analysed in agarose gel electrophoresis. *Ny. neivai* the only species found. A total of 3,870 (387 pools) female of *Ny. neivai* was submitted to the multiplex PCR. The multiplex PCR results for *Leishmania* detection in sandflies were negative. The islands studied still preserve the native forest that favors the enzootic cycle of *Leishmania*. Therefore, the multiplex PCR was standardized, enabling determination of the infection rate of sandflies by members of the genus *Leishmania* in a single analysis, with certainty that the material analyzed is suitable for PCR. Moreover, the multiplex PCR is particularly useful when a large number of sandflies has to be analyzed, like in this research. Although no natural infection of *Ny. neivai* by *Leishmania* was found in this study, previously, on Mutum Island, *Ny. neivai* was detected with natural infection by *Leishmania* (*Viannia*), demonstrating the importance of this species in the epidemiology of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Sandflies, Tegumentary leishmaniasis, Multiplex PCR, *Leishmania*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. LT. (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada.....	17
Figura 2. Leishmania, forma flagelada ou promastigota.....	18
Figura 3. Leishmania, forma aflagelada ou amastigota.....	18
Figura 4. ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> .....	20
Figura 5. O diagnóstico da LT pode ser epidemiológico, clínico e laboratorial (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico).....	21
Figura 6. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (foto ampliada).....	22
Figura 7. Canal fechado (Ressaco) resultante da anexação da barra lateral na ilha Mutum, Rio Paraná, Município de Porto Rico.....	24
Figura 8. Ilha Mutum em tempos diferentes: à esquerda, foto aérea 1970 com a superfície pouco vegetada; à direita imagem Google Earth™, 2013, com superfície da ilha recomposta de vegetação natural secundária.....	25
Figura 9. Ambientes de ressaco, lagoa, pântano e terrestre da ilha Mutum com vegetação de portes diferenciados conforme os ambientes.....	25
Figure 1 Islands of Paraná River where sandflies were collected, the municipalities of São Pedro de Paraná, Porto Rico and Querência do Norte, state of Paraná, southern Brazil.....	42
Figure 2 Multiplex PCR in 3% of agarose gel showing fragments of 120-bp and 220-bp. The fragment of 120-bp from the kDNA mini circle region of genus <i>Leishmania</i> were amplified with A1 and A2 primers. The fragment of 220-bp from the IVS6 <i>cacophony</i> gene region of the insects of genus <i>Lutzomyia</i> were amplified with 5Llcac and 3Llcac primers.....	43
Figure 1 Islands of Paraná River where sandflies were collected, the municipalities of São Pedro de Paraná, Porto Rico and Querência do Norte, state of Paraná, southern Brazil.....	57
Table 1 Hourly mean (HM) of sandflies of the <i>Nyssomyia neivai</i> species collected in the Paraná River islands, State of Paraná, Brazil, from 2012 to 2014.....	58

Tese elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (artigo 1) disponível em: < [http://www.liebertpub.com/products/manuscript.a\\_spx?pid=67](http://www.liebertpub.com/products/manuscript.a_spx?pid=67) > e *Journal of Medical Entomology* (artigo 2) disponível em: < [https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript\\_Preparation](https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation)

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	15
1.1	Histórico das leishmanioses.....	15
1.2	Dados epidemiológicos.....	16
1.3	A doença.....	16
1.4	<i>Leishmania</i> spp.....	17
1.5	Diagnóstico.....	20
1.6	Flebotomíneos.....	22
1.7	Ilhas do Rio Paraná.....	23
1.8	Justificativa.....	25
1.9	Objetivos.....	26
2.0	Referências.....	27
2	CAPÍTULO II.....	30
2.1	Artigo 1: Multiplex polymerase chain reaction for detection of <i>Leishmania</i> sp. in sandflies of the Paraná River islands, southern Brazil.....	30
2.2	Artigo 2: Predominance of <i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto) on the islands of the Paraná River, Southern Brazil.....	44
3	CAPÍTULO III.....	59
3.1	Conclusões.....	59
3.2	Perspectivas futuras.....	60

## CAPÍTULO I

### HISTÓRICO DAS LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoário do gênero *Leishmania*, a leishmaniose cutânea (LC) é popularmente conhecida, no Peru, por “botão de Aleppo”, “bolha de Delhi”, “bolha de Bagdad”, “botão de Biskra”, “úlcera de Calcutta”, entre outros, e no Brasil por “úlcera de Bauru”, “botão da Bahia”, “ferida brava”, entre outros (STOWERS; CASTELLANI, 1920).

Em 1835, na Grécia, foram encontrados os primeiros relatos de leishmaniose visceral (LV), anteriormente denominada de “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Na Índia, em 1869, foi denominada de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (MARZOCHI, 1981).

No Brasil em 1934, Henrique Penna relatou os primeiros caso da infecção por LV (RANGEL; LAINSON, 2003). Evandro Chagas suspeitou que o agente etiológico da doença fosse transmitido ao homem pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* devido sua constante presença no domicílio e peridomicílio de pacientes doentes (RANGEL; LAINSON, 2003).

No Brasil, as lesões cutâneas e nasofaríngeas de LT foram confirmadas pela primeira vez em 1909, por Lindenber, que encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em lesões cutâneas em indivíduos que trabalhavam nas matas no interior do Estado de São Paulo (PESSOÃ, 1982). Em 1922, Gaspar Vianna denominou o agente etiológico da leishmaniose de *Leishmania braziliensis* (SILVEIRA et al., 1997).

Até a década de 70 todos os casos LT no Brasil eram atribuídos a *Leishmania braziliensis*, mas com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos, outras seis espécies de *Leishmania* foram descritas (BASANO; 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 Estado (TEODORO et al., 2010).

### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

As leishmanioses possuem ampla distribuição mundial, com registro de 14

milhões de casos em 98 países, onde 350 a 400 milhões de pessoas vivem sob risco de se infectarem por *Leishmania* spp. (SILVA; OLIVEIRA, 2016).

Estima-se que ocorram 200 a 400 mil novos casos humanos anuais de LV no mundo. Em 2014, aproximadamente de 90% dos casos novos notificados estavam distribuídos em seis países: Brasil, Bangladesh, Etiópia, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Na Ásia, programas de redução da ocorrência de LV estão tendo sucesso e o número de casos diminuiu em Bangladesh, Índia e Nepal (OMS, 2016). A LV atualmente é endêmica em 12 países das Américas. No período compreendido entre 2001 e 2013 foram registrados 45.490 casos, com uma média anual de 3.499 casos (OPAS/OMS, 2015). Este número pode estar relacionado à interferência humana na natureza, fatores econômicos e sociais.

O Brasil concentra 96% dos casos de LV das Américas, com uma incidência de 4,35 casos por 100.000 habitantes (OPAS/OMS, 2015), e com média de letalidade, no período de 2000 a 2015, de 6,7, sendo que em 2015 a taxa foi de 7,8 (BRASIL, 2016).

No período de 2010 a 2017, foram confirmados 1.513 casos de LV, com 108 óbitos, no estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2017a). Cabe lembrar que este estado tem fronteira com Paraná.

Na América do Sul, o Brasil é o país onde há maior ocorrência de LT, com 90% dos casos de todo o continente (WHO, 2017). A doença 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 (BRASIL, 2012) e representa 94,9% dos 14.217 casos notificados na região sul do Brasil de 1990 a 2016 (BRASIL, 2017b).

## **A DOENÇA**

As leishmanioses têm grande importância em saúde pública, constituindo um complexo de doenças com diferentes formas clínicas e epidemiológicas. Em geral, a LT apresenta duas formas básicas de expressão: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, que podem apresentar diferentes manifestações clínicas (BRASIL, 2017c). A LT caracteriza-se por úlceras, nódulos únicos ou múltiplos na pele, com lento desenvolvimento, e que geralmente cicatrizam espontaneamente (WHO, 2017).



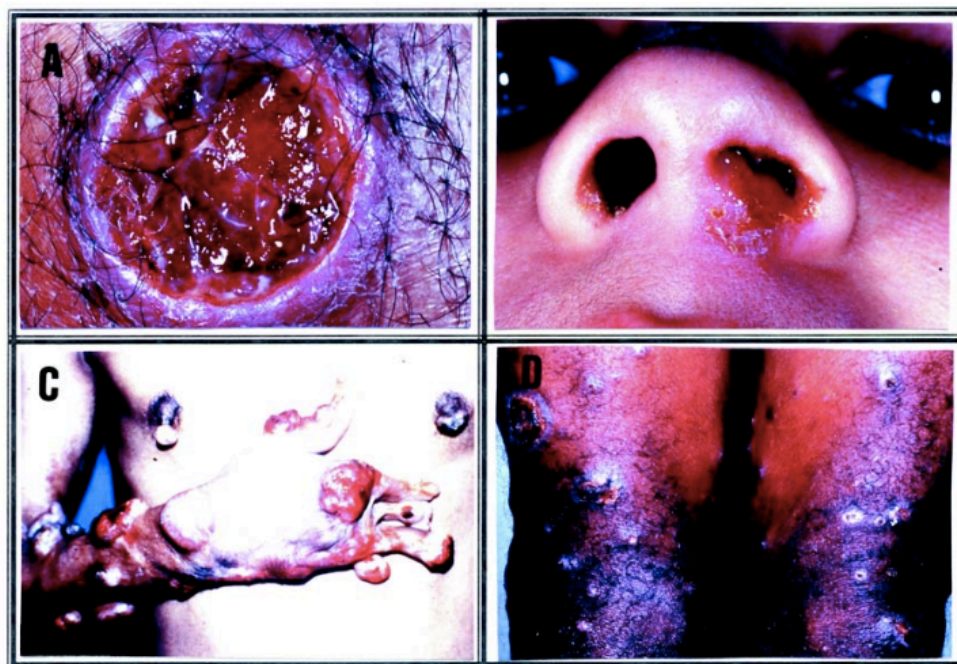


Figura 1. LT. (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada. Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003.

A LV é a forma mais grave de leishmaniose. A LV é uma doença crônica que pode ser fatal para o homem, com letalidade de até 10% dos pacientes, na ausência de diagnóstico e tratamento precoces. No Brasil, o agente etiológico da LV é *Leishmania (Leishmania) infantum* (Cunha e Chagas), enquanto a LT tem como principais agentes etiológicos *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRASIL, 2017c). No estado do Paraná *L. (V.) braziliensis* é responsável pela maioria das infecções humanas.

### ***LEISHMANIA* spp.**

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

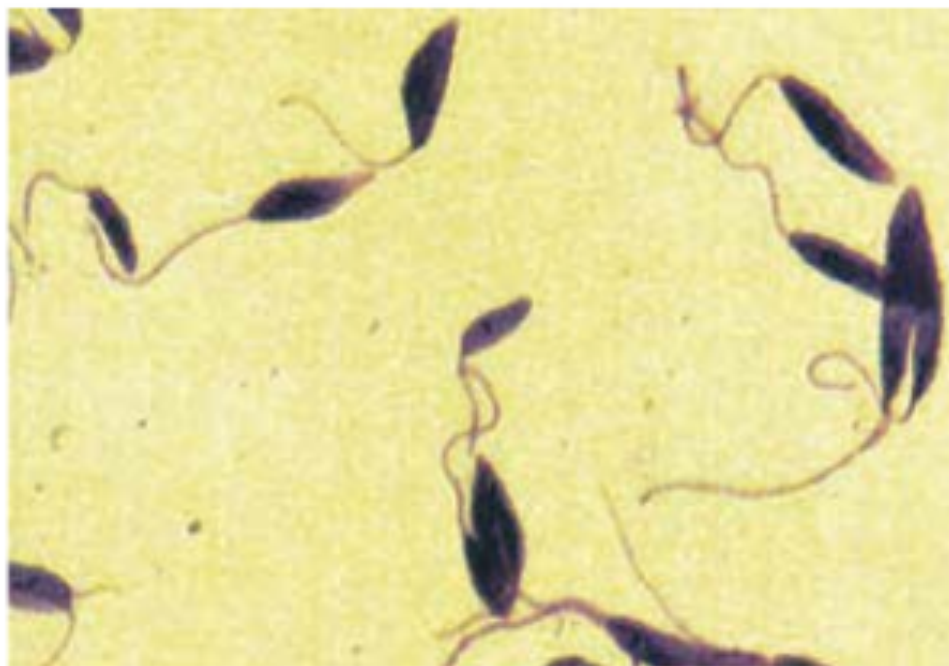


Figura 2. Leishmania, forma flagelada ou promastigota. Fonte: BRASIL, 2017c.

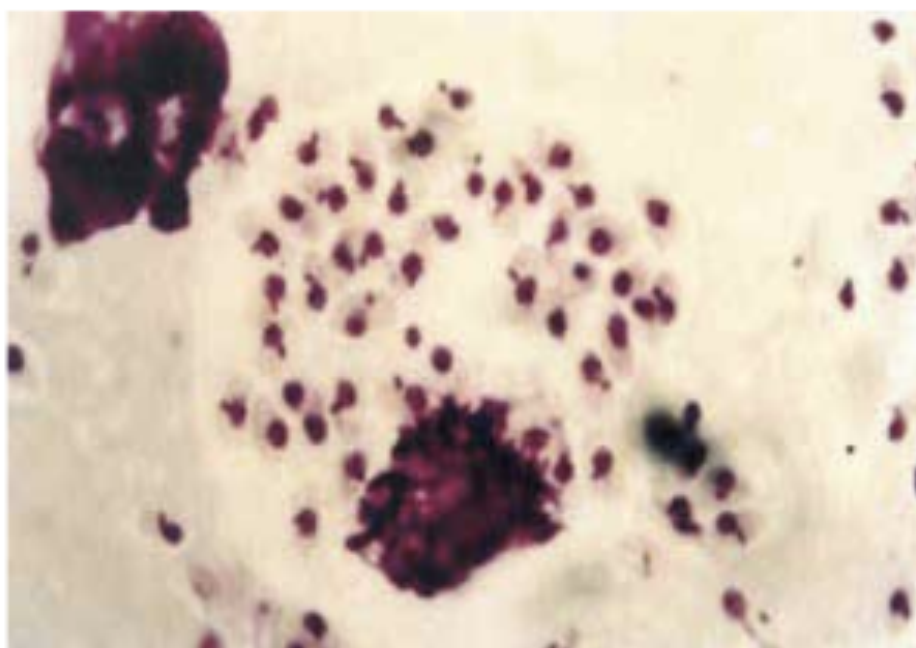


Figura 3. Leishmania, forma aflagelada ou amastigota. Fonte: BRASIL, 2017c.

Os vetores de *Leishmania* são flebotomíneos fêmeas (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae) que sugam o sangue de um animal mamífero infectado com as formas amastigotas, que se alojam no intestino do inseto, onde se transformam em promastigotas, com formas alongadas e 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., 2017).

No Brasil, são descritas sete espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie de maior importância pela sua ampla distribuição, produzindo lesões cutâneas e mucosas no homem; *L. (V.) guyanensis*, ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Roraima e ocasiona no homem a forma cutânea, com múltiplas lesões, mas pode também acometer a mucosa; *Leishmania (Viannia) naiffi* ocorre nos estados do Pará e Amazonas, provocando no homem lesão de evolução benigna; *Leishmania (Viannia) shawi* é responsável por casos esporádicos no Maranhão e Pará; *Leishmania (Viannia) lainsoni*, foi descrita no Acre, Pará e Roraima; *Leishmania (Viannia) lindenberg*, presente no Pará e até o momento foi isolada apenas de casos humanos; e *L. (L.) amazonensis*, ocorre nas regiões 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, 2017c).

### **Ciclo evolutivo da *Leishmania***

Este protozoário é transmitido pela picada da fêmea de flebotomíneo infectado. Na saliva do inseto há substâncias quimiotáticas para monócito e neuropeptídeos vasodilatadores que facilitam a ingestão de formas promastigotas de *Leishmania* e ao mesmo tempo imunossuprimem a resposta do hospedeiro inibindo a produção de antígenos. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea inocula as formas promastigotas metacíclicas provenientes da região anterior do trato digestivo. No hospedeiro vertebrado, os macrófagos fagocitam as formas promastigotas, ocorrendo uma diferenciação destas formas em amastigotas, que se reproduzem por divisão binária, até o rompimento das células fagocitárias, gerando uma resposta inflamatória e iniciando um novo ciclo.

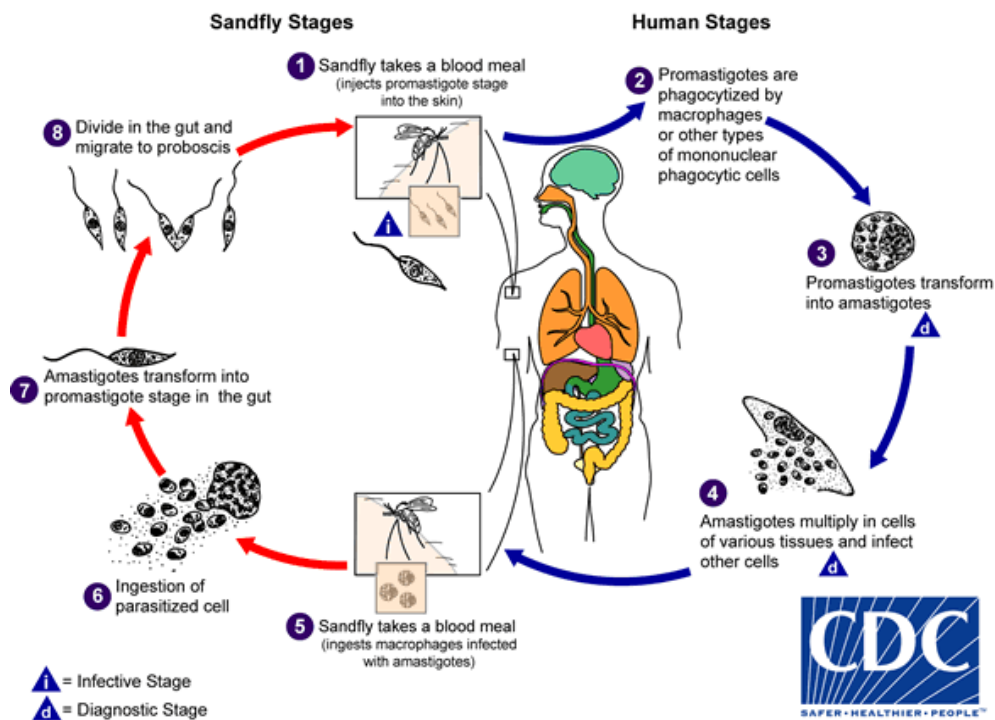


Figura 4. ciclo evolutivo da *Leishmania*. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013.

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LT envolve fatores epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico). Normalmente é necessária a conjugação de mais de um desses resultados para se chegar ao diagnóstico final (Figura 5) (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

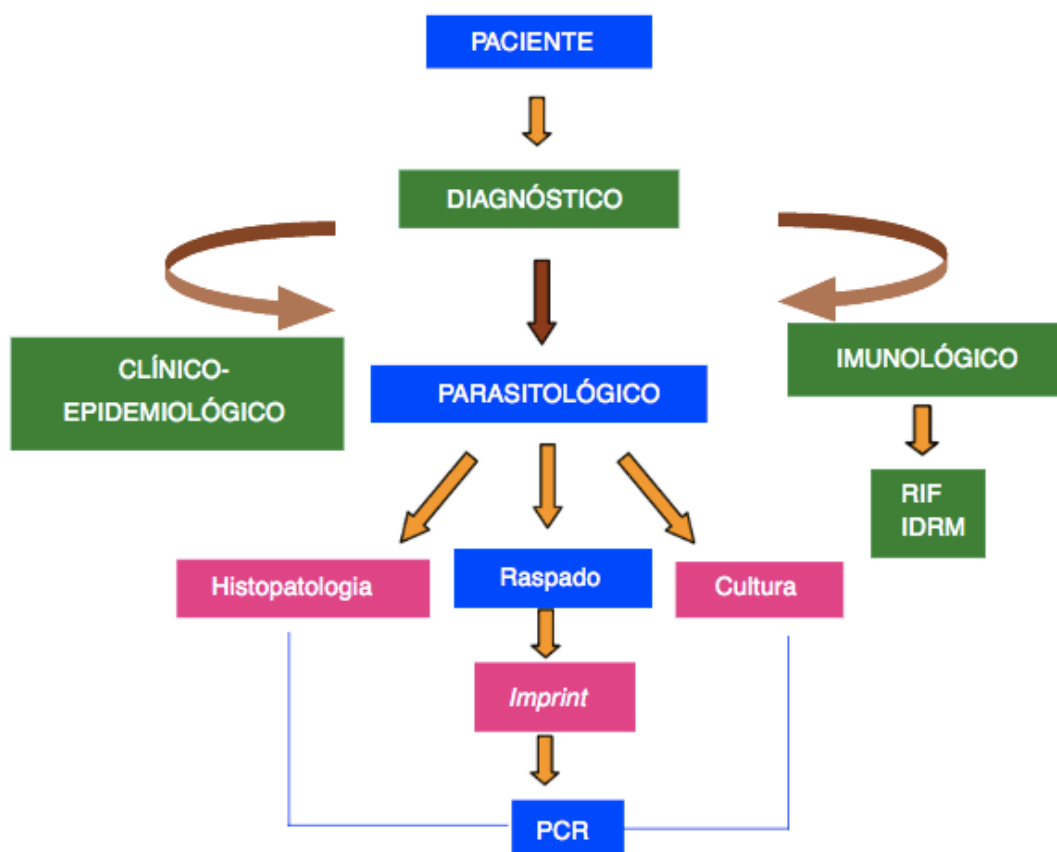


Figura 5. O diagnóstico da LT pode ser epidemiológico, clínico e laboratorial (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico). Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003.

O diagnóstico diferencial da LT é importante devido à semelhança com outras enfermidades como câncer de pele, lepra e tuberculose (GOTO, 2010). Na LV, a semelhança clínica ocorre com várias outras doenças como malária, tuberculose disseminada, linfomas, salmoneloses, citomegalovírus, toxoplasmose, entre outras. Os métodos convencionais de diagnóstico incluem testes parasitológicos, como a pesquisa direta do parasito em material de lesão (PD), ou em tecidos, e a cultura; e testes imunológicos, como a pesquisa de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFI), enzima imunoensaio (ELISA), Reação em Cadeia da Polímera (PCR), Múltipla Reação em Cadeia da Polimerase (Multiplex-PCR), entre outros.

A detecção da *Leishmania* é crucial para o diagnóstico diferencial e início da terapia. Desde 1990, com a detecção do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), métodos moleculares como os diferentes formatos da PCR vêm sendo utilizados para o diagnóstico das leishmanioses, por possuírem alta sensibilidade e superarem os problemas encontrados pelas metodologias convencionais (WEIGLE et al., 2002; BEN ABDA et al., 2011). Esses

métodos são práticos, seguros e confiáveis, e permitem a identificação da espécie infectante em uma variedade de amostras biológicas. O diagnóstico molecular é especialmente importante em regiões onde várias formas da doença estão envolvidas com espécies distintas de *Leishmania* (GOTO, 2010).

## FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae) são insetos hematófagos, responsáveis pela transmissão dos parasitos que causam as leishmanioses. São pequenos e, dificilmente ultrapassam 0,5 cm de comprimento, as pernas são longas e delgadas e o corpo densamente piloso (Figura 6). Têm como característica o voo saltitante e mantêm as asas eretas quando em repouso. Somente as fêmeas de flebotomíneos têm aparelho bucal apropriado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (DIAS, 2011).



Figura 6. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (foto ampliada). Fonte: Brasil, 2017c.

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

As espécies *Nyssomyia neivai* (Pinto), *Nyssomyia whitmani* (Antunes e 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). A principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão de *L. chagasi* é *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), seguida de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (ALMEIDA et al., 2010).

Os criadouros de flebotomíneos se localizam em detritos nas fendas de rocha, cavernas, raízes de vegetação no solo, entre folhas mortas e úmidas (REINHOLD-CASTRO et al., 2013).

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

## **ILHAS DO RIO PARANÁ**

As ilhas do Rio Paraná formam um complexo de mais de 70 ilhas, das quais foram escolhidas para a coleta de flebotomíneos número de ilhas no município de Porto Rico (nome das ilhas), número de ilhas no município de Querência do Norte e número de ilhas São Pedro do Paraná (nome das ilhas, estado do Paraná). As ilhas escolhidas têm áreas distintas, algumas são habitadas pelo homem e outras não. Estas 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 e uma avifauna rica 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; 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 (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 7). “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. O canal é fechado a montante e aberto na jusante, onde a conexão com as águas do canal ocorre normalmente, mas sem fluxo e evidencia bem um ambiente lântico. 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 (Figura 8 e 9) (LELI et al., 2013).



Figura 7. Canal fechado (Ressaco) resultante da anexação da barra lateral na ilha Mutum, Rio Paraná, Município de Porto Rico. Fonte: LELI et al., 2013.



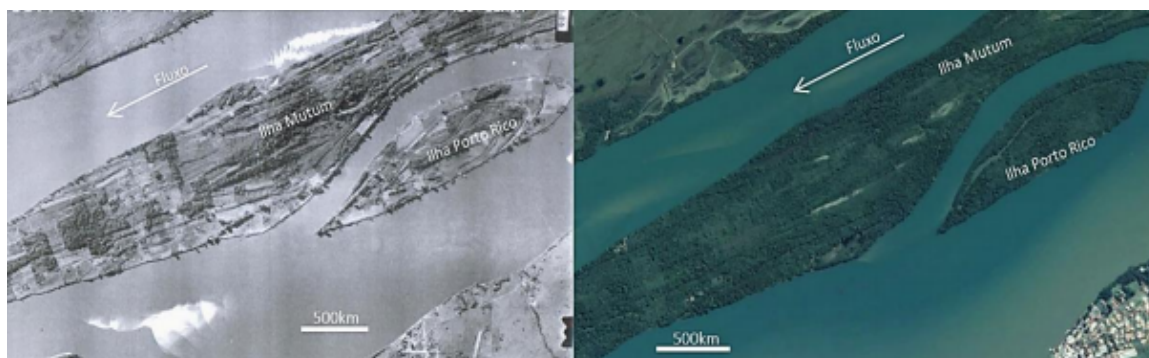


Figura 8. Ilha Mutum em tempos diferentes: à esquerda, foto aérea 1970 com a superfície pouco vegetada; à direita imagem Google Earth™, 2013, com superfície da ilha recomposta de vegetação natural secundária. Fonte: LELI et al., 2013.

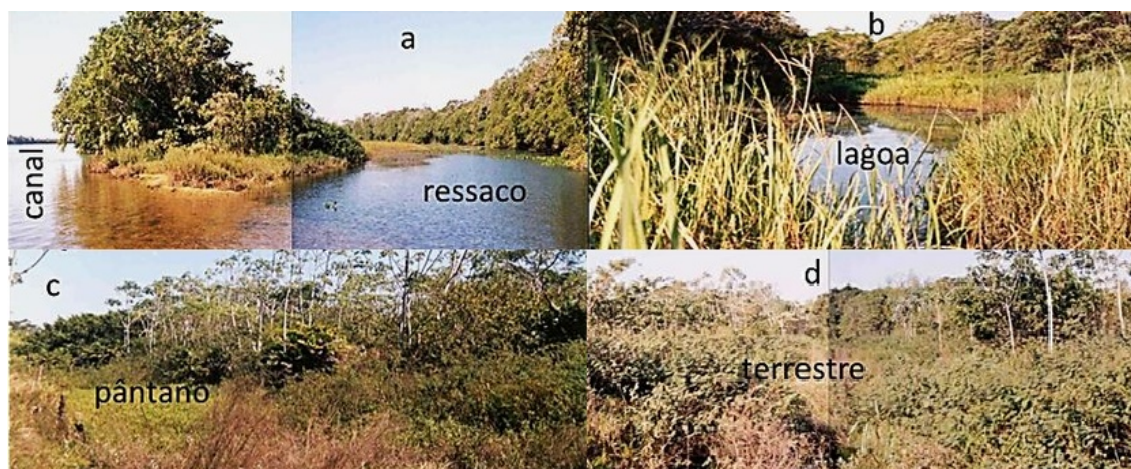


Figura 9. Ambientes de ressaco, lagoa, pântano e terrestre da ilha Mutum com vegetação de portes diferenciados conforme os ambientes. Fonte: LELI et al., 2013.

As ilhas do Rio Paraná são endêmicas para LT, fazem divisa com os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, que são endêmicos para LV, que é a forma mais grave de leishmaniose. Anteriormente, Santos et al., (2016), na ilha Mutum, detectaram a infecção natural de *Leishmania* em *Ny. Neivai*. Nesta ilha foram constatados três casos humanos de LT em dois habitantes permanentes da ilha e um turista, além de oito cães com LT (informação pessoal Cristóvão E. C. e Membrive N. A.).

## JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças negligenciadas, com ocorrência em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2012). No Paraná, a LT tem sido notificada na maioria dos municípios (LIMA et al., 2002).

Apesar dos diversos estudos realizados no estado do Paraná sobre flebotomíneos, as ilhas do rio Paraná ainda não foram contempladas com o desenvolvimento de

pesquisas com esses insetos, embora haja notificações da doença em habitantes permanentes e indivíduos que as frequentam em busca de lazer (pesca, praias e turismo). Isto justifica a realização de estudos sobre a fauna, comportamento de flebotomíneos, a taxa de infecção natural desses insetos por *Leishmania* e a identificação das espécies de *Leishmania* nas ilhas em questão. A padronização da multiplex-PCR pode auxiliar na pesquisa de flebotomíneos com infecção natural por *Leishmania* em uma única reação.

Os resultados da pesquisa podem vir a auxiliar os trabalhos da 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 domicílio e peridomicílio pode diminuir a incidência das leishmanioses nos habitantes permanentes e indivíduos que frequentam as ilhas em atividades de lazer.

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Conhecer a fauna, o comportamento de flebotomíneos e padronizar a multiplex-PCR para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneo de ilhas do Rio Paraná, noroeste do estado do Paraná, Brasil.

### **ESPECÍFICOS**

Coletar flebotomíneos no domicílio, peridomicílio e matas em diferentes ilhas do rio Paraná.

Identificar as espécies de flebotomíneos coletados.

Padronizar a técnica multiplex-PCR para detecção de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

Pesquisar a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUIAR, LM, LUDWIG, G, SVOBODA, WK, HILST, CLS, NAVARRO, IT and PASSOS, FC. Occurrence, local extinction and conservation of Primates in the corridor of the Upper Paraná River, with notes on other mammals. Rev. Bras. Zool., v. 24, p. 898–906. 2007

ALMEIDA, PS, NASCIMENTO, JC, FERREIRA, AD, MINZÃO, LD, PORTES, F, MIRANDA AM, FACCENDA, O e ANDRADE FILHO, JD. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Entomol.*, v. 54, p. 304–310. 2010

BASANO, SA e CAMARGO, LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 3. 2004.

BEN ABDA I, DE MONBRISON F, BOUSSLIMI N, AOUN K, BOURATBINE A, PICOT S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 105, n. 1, p. 17–22. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p. 2007.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, de 1990 a 2011. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. 2016.

BRASIL. Ministério da saúde [Internet] Gerência Técnica de Zoonoses/ CCV/ SGVS/ SES - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/SES). 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde [Internet]. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. 2017b.

BRASIL, Ministério da Saúde [Internet]. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 191 p. 2017c.

CDC-Center for Disease Control and Prevention - Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Última revisão: 10 de janeiro de 2013. Acessado em 23 de dezembro de 2017.

DIAS ES. Psychodidae. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 12 ed.: 377-85. 2011.

GONTIJO, B, CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 71-80. 2003

GOTO HLJ. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v. 8, n. 4, p. 419-433. 2010

LELI, IT, STEVAUX, JC e ASSINE, ML. Canal fechado (ressaco) em grandes sistemas de rios anabranching: exemplo do alto curso do rio Paraná. *Anais do Sexto Simpósio Regional sobre Hidráulica de Ríos. Santa Fe, Argentina*, pp. 1-6. 2013.

LIMA, AP, 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: 681-692. 2002

MARZOCHI, MCA, COUTINHO, SG, SOUZA, WJ, AMENDOEIRA, MR. Leishmaniose Visceral (Calazar). *J. Bras. Med.*, v. 41, p. 61-84. 1981.

MELO, SCCS. 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.

NEVES, Taise dos Santos. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. 2017. 22 f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2017.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Leishmanioses. Nota descritiva, Setembro, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>. Acessado em 04 de janeiro de 2018.

OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Americas. Informe Leishmaniose nº 3 – Julho 2015. Disponível em: <https://bit.ly/2JYOsIe>. Acessado em 02 de março de 2018.

PESSÔA, SM. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982.

RANGEL, EF, LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. *Lutzomyia longipalpis* e a Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. c. 6, p. 310-336. 2003.

REINHOLD-CASTRO, KR; SCODRO, RBL; DIAS-SVERSUTTI, AC; NEITZKE, HC; ROSSI, RM; KÜHL, JB; SILVEIRA, TGV; TEODORO, U. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, p. 269-276. 2008.

REINHOLD-CASTRO KR, FENELON VC, ROSSI RM, BRITO JEC, et al. Impact of control measures and dynamics of sand flies in southern Brazil. *J. vector ecol.*, 38:63-68. 2013.

RASO, P e GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BRASILEIRO GF et al. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994.

SHIMABUKURO, PHF; GALATI, EAB. 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.

SOUZA-FILHO, EE e STEVAUX, JC. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Curutuba, 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, p. 3-46. 1997.

STOWERS, JH, CASTELLANI, A. A Case of Delhi Boil or Sore (Syn: Oriental Sore; Aleppo Boil). Br. J. Dermatol., v. 32, n. 8, p. 263-265. 1920.

SILVA, AM; CAMARGO, NJ; SANTOS, DR; MASSAFERA, R; FERREIRA, AC; POSTAI, C; CRISTÓVÃO, EC; KONOLSAISEN, JF; ISETTO, JRA; PERINAZO, R; TEODORO, U e GALATI, EAB. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. Neotrop Entomol., v. 3, p. 209-225. 2008.

SILVA TF e OLIVEIRA AB. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. Rev Fitos Eletrônica, v. 10, n. 3. 2016.

SILVEIRA FT, LAINSON R, BRITO AC, OLIVEIRA MRF, PAES MG, SOUZA AAA, SILVA BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: LEÃO RNQ. Doenças Infeciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP. 1997.

TEODORO, U e KÜHL, JB. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) intermedia (*Lutz & Neiva*, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. Rev. Saúde Públ., v. 31: 512-516. 1997.

TEODORO U, SANTOS DR, SANTOS AR, OLIVEIRA O, POIANI LP, SILVA AM, NEITZKE HC, MONTEIRO WM, LONARDONI MVC, SILVEIRA TGV. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. Rev. Saúde Públ., v. 40, p. 327-330. 2006.

TEODORO U, SANTOS DR, SILVA AM, MASSAFERA R, IMAZU LE, MONTEIRO WM e NEITZKE-ABREU, HC. Fauna de Flebotomíneos em Municípios do Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 39, p. 322-330. 2010.

WEIGLE KA, LABRADA LA, LOZANO C, SANTRICH C, BARKER DC. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*). J. Clin. Microbiol., v. 40, n. 2, p. 601-606. 2002.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Available at: <<http://goo.gl/PiM9n>>. Accessed on December 12, 2017. 2017.

## CAPÍTULO II

**Artigo 1: “MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF *Leishmania* sp. IN SANDFLIES OF THE PARANÁ RIVER ISLANDS, SOUTHERN BRAZIL”**

## **Multiplex PCR in insular sandflies**

### **Multiplex polymerase chain reaction for detection of *Leishmania* sp. in sandflies of the Paraná River islands, southern Brazil**

Corresponding author: Barbara Andreo dos Santos. Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo 5790, Maringá, 87020-900, Paraná, Brazil.

Telephone contact: +55 44 99948-8781

E-mail: baandreo@hotmail.com

#### **Abstract**

Leishmaniases are classified as tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL). Brazil is among the countries with the highest number of TL and VL cases. This study was undertaken to standardize the multiplex PCR for the detection of the genus *Leishmania* in sandflies of endemic regions, on islands in the Upper Paraná River, northwestern Paraná. The sandflies were collected on ten islands, from November 2012 to November 2014, with Falcão light traps, identified and conserved in tubes containing isopropanol, for subsequent DNA extraction. Two pairs of primers were used for multiplex PCR: A1/A2 and 5Llcac/3Llcac. *Nyssomyia neivai* was the predominant species of the collected specimens. A total of 3,870 samples of female sandflies were analyzed and submitted to multiplex PCR, for the validation of the technique. All pools showed the 220-bp fragment for sandfly DNA detection, but no  $\approx$ 120-bp fragment of *Leishmania* DNA was found. Although no natural infection of *Ny. neivai* by *Leishmania* was found in this study, the interaction of sandflies with *Leishmania* and its natural

reservoirs continues in these Paraná River islands, despite the low diversity of the sandfly fauna. Some of these islands have permanent residents and are frequented by tourists.

Key words: zoonotic cutaneous leishmaniasis, *Leishmania*, polymerase chain reaction, sandflies.

## **Introduction**

Leishmaniasis are classified as tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL) and are found in tropical and subtropical regions worldwide. In Brazil, TL has been recorded in all the states and is endemic in Paraná state, with 94.9% (14,217) of the cases in the 1990-2016 period in southern Brazil (Brasil 2017). The VL transmission has been described mostly in the northeast, southeast and center-west regions of Brazil. However, the number of cases has increased in the states of Mato Grosso do Sul and São Paulo, which border Paraná, especially in the last 20 years (Brasil 2015a, Santos et al. 2012). In Paraná, canine visceral leishmaniasis was recorded in 2013, and the first human case of VL was confirmed in July 2015 (Brasil 2015b, Trench et al. 2016).

In studies of natural sandfly infection rates, the polymerase chain reaction (PCR) has been widely used to detect *Leishmania* DNA, because of its high sensitivity and specificity (Michalsky et al. 2002). Considering the TL is endemic in several municipalities in Paraná and VL has been reported in the states neighboring Paraná, this study was undertaken to standardize the multiplex PCR technique for the detection of the genus *Leishmania* in sandflies of endemic regions, on islands in the Upper Paraná River, northwestern Paraná, Brazil.

## **Material and methods**

Sandflies were collected on Mutum, Bandeira, Chapéu Velho, Japonesa, Santa Rosa, and Carioca islands. These islands are located close together, in the municipality of



Porto Rico (22°46'S and 53°16'W). Sandflies were also collected on Fina and Floresta islands in the municipality of Querência do Norte (23°05'S and 53°29'W); and on São José Catarino and Cruzeiro islands in the municipality of São Pedro do Paraná (22°49'S and 53°13'W). These ten islands are situated in the middle stretch of the Upper Paraná River in northwestern Paraná, within the Environmental Protection Area of Islands and Lowlands of the Paraná River (Fig. 1). The number of residences varies from island to island; some of them are occupied only part of the year, because of the environmental protection regulations.

The sandflies were collected with Falcão light traps at night, in five different ecotopes on the islands: interior of the forest, forest edge, uninhabited residence, inhabited residence, domestic-animal shelter, and abandoned domestic-animal shelter. The collections were performed from November 2012 to November 2014. On Mutum Island the collections totaled 156 hours per trap. On most other islands, 48 hours in each ecotopes. The total trap-hours differed on three islands: Carioca Island, a total of 5 hours per trap; on Fina Island, 12 hours per trap; and on Bandeira Island, 29 hours per trap. Samples of the insects collected on each island were randomly chosen for multiplex PCR.

The insects were processed according to Oliveira et al. (2011), and identified at the Leishmaniasis Laboratory in the Department of Clinical Analyses and Biomedicine of the Universidade Estadual de Maringá (Paraná State, Brazil). The collected sandflies were killed with chloroform and conserved in tubes containing isopropanol 80%, for identification and subsequent DNA extraction (Santos et al. 2016). The nomenclature follows Galati (2003), and abbreviations follow Marcondes (2007).

DNA was extracted according to Loxdale and Lushai (1998), with modifications. The isopropanol-preserved insects were macerated with a plastic pestle in a microtube containing 200 µL of a solution of 5% Chelex resin. For every 22 samples extracted, we used a positive control (male sandflies plus 10·promastigotes of *L. (V.) braziliensis*) and a

negative control (male sandflies). The DNA was stored at 4°C until use.

For the multiplex PCR two pairs of primers were used for DNA amplification: A1 (5'-(G/C)(G/C)(C/G) CC (A/C) CTA T (A/T) T TAC ACC AAC CCC) and A2 (5'-GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA), which amplify a fragment of ≈120 bp of the conserved region of DNA from the minicircle of the kinetoplast (kDNA) of genus *Leishmania* (Romero et al. 2001); and 5Llac (5'-GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG-3') and 3Llac (5'-CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC-3'), which amplify a fragment of 220 bp from the IVS6 *cacophony* gene region of insects of genus *Lutzomyia* (Lins et al. 2002). The PCR reaction mixture (final volume 25 µL) was composed of 0.5 µM of each primer (Invitrogen), 0.24 mM dNTP (Invitrogen), 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1× enzyme buffer, and 2 µL DNA template. The amplification was carried out in a G96G & G96GEN cycler (Biosystems) at 95°C for 5 min for initial denaturation, followed by 35 cycles, each divided into three stages, of denaturation (30 s at 95°C), annealing (30 s at 55°C), and polymerization (30 s at 72°C). Next, the extension was continued for a further 10 min at 72°C, and the tubes were kept at 4°C until analysis. Positive controls [*L. (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum* DNA], and a negative control (reaction mixture plus water) were added for each amplification set/round.

The amplification products were submitted to electrophoresis in 3% agarose gel, stained with 0.1 µg/mL ethidium bromide, at 10–15 V/cm. The presence of bands was observed in a transilluminator (Lo MacroVue™ UV-20, Hoefer).

For the multiplex PCR standardization were tested 0.20 mM and 0.24 mM of dNTP used in the reaction mixture. The annealing temperature tested were 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, and 55°C. The number of cycles tested were 25, 26, 30, and 35.

Samples of DNA from *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8 Isolate IOCL 0575), and *L. (L.) infantum*

(MHOM/BR/2002/LPC-RPV isolate IOCL 2906) were used as controls.

To determine the limit detection of the multiplex PCR technique for *Leishmania* DNA, different concentrations of *Leishmania* DNA were added to 200 pg of male sandfly DNA and analyzed. The concentrations of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* were 1 pg, 100, 10, 1, 0.1 fg, and of *L. (L.) amazonensis* were 100, 10, 1, 0.1, 0.01 fg. The multiplex PCR technique was already tested for detecting DNA from *Trypanosoma cruzi* (1256 DTU II).

### Results and Discussion

Initially, the multiplex PCR was standardized. The best results were obtained using 0.24 mM dNTP, annealing temperature of 55°C, 30 s and 35 cycles. In these conditions, a band of 220 bp was obtained for the IVS6 *cacophony* gene region and a band of ≈120 bp was obtained for *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* (Fig. 2). In order to determine the *Leishmania* species detected by multiplex PCR, another PCR specific to *Leishmania* species would be necessary.

A total of 76,145 sandflies were collected on the islands. An amount of 3,870 samples of female sandflies were randomly separated and submitted to multiplex PCR. All were *Ny. neivai* (Pinto). A 220 bp fragment from the IVS6 *cacophony* gene region of the sandflies was detected in the 387 pools of sandflies tested, each pool with 10 females, demonstrating the absence of Taq DNA polymerase inhibitors. No ≈120bp fragment of *Leishmania* DNA was found (Fig. 2A). Therefore, no natural infection was detected in the sandfly samples analyzed.

The limit of detection of the multiplex PCR using A1-A2 and 5Llcac-3Llcac primers was 10 fg of *L. (V.) braziliensis* DNA (Fig. 2B) and *L. (L.) infantum* DNA (Fig. 2C), and 1 fg of *L. (L.) amazonensis* DNA (Fig. 2D). The DNA of *T. cruzi* was not detected.

No natural infection by *Leishmania* sp. was observed in the *Ny. neivai* specimens

analyzed. However, in a previous study conducted on Paraná River islands, Santos et al. (2016) detected *Leishmania* in *Ny. neivai*, and three human cases of TL (two of these in permanent residents of the island) and eight canine cases of TL were reported from Mutum Island in 2008 (E.C. Cristóvão and N.A. Membrive, personal communication). In addition, *Ny. neivai* naturally infected by *Leishmania* were also found in Paraná state by Oliveira et al. (2011) and Neitzke-Abreu et al. (2014). Marcondes et al. (2009), Pita-Pereira et al. (2009), and Córdoba-Lanús et al. (2006) found natural infections in this species in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, and in Argentina, respectively.

*Ny. neivai*, *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Migonemyia migonei* (França) and *Pintomyia fischeri* (Pinto) are frequently reported in TL endemic areas in Brazil (Teodoro et al. 2006, Reinhold-Castro et al. 2013). Nevertheless, we collected sandflies of only one species, *Ny. neivai*. The predominance of this species has been reported previously. Santos et al. (2016) found 99.9% predominance of *Ny. neivai*, two specimens of *Ny. whitmani*, and one of *Psathyromyia shannoni* (Dyar) on four of the ten islands studied here. J.C. Gasparotto et al. (unpublished data) found a similar predominance of *Ny. neivai* on Mutum Island. Studies in Doutor Camargo municipality, Paraná state, have shown that this species is well adapted to modified environments and forest edges (Reinhold-Castro et al. 2013).

*Ny. whitmani* and *Ny. neivai* are vectors of *L. braziliensis* (Oliveira et al. 2011, Neitzke-Abreu et al. 2014, Marcondes et al. 2009, Pita-Pereira et al. 2009, Córdoba-Lanús et al. 2006). However, in Minas Gerais, Saraiva et al. (2010) found that these sandfly species were infected with *L. infantum*, the causative agent of visceral leishmaniasis, a potentially fatal disease. Santos et al. (2012) reported the first find of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Foz do Iguaçu, Paraná state. It is worth remembering the increase in the number of VL cases in the states of

Mato Grosso do Sul and São Paulo, which border Paraná, especially in the last 20 years (Brasil 2015a, Almeida et al. 2013). In addition, Paraná state is considered endemic for *L. braziliensis* - caused TL in humans; however, in Cambé municipality in the same state, Hoffmann et al. (2012) reported a dog with leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*; and Silveira et al. 1990) reported a case of TL caused by *L. amazonensis* in a patient from Maringá, who frequently fished in the Ribeirão Pinguin River, Floresta municipality.

The above findings indicate the importance of using PCR testing for the genus *Leishmania* in sandflies. If the parasite is detected, the particular species of *Leishmania* could be determined, using specific primers. It is important to determine the geographical distribution of these protozoa for epidemiological surveillance of the disease, since human-caused environmental changes can lead to changes in the sandfly fauna, with a consequent redistribution of *Leishmania* species in different areas.

Therefore, the multiplex PCR was standardized, enabling determination of the infection rate of sandflies by members of the genus *Leishmania* in a single analysis, with certainty that the material analyzed is suitable for PCR. Moreover, the multiplex PCR is particularly useful when a large number of sandflies has to be analyzed, like in this research. Although no natural infection of *Ny. neivai* by *Leishmania* was found in this study, the interaction of sandflies with *Leishmania* and its natural reservoirs continues in these Paraná River islands, despite the low diversity of the sandfly fauna. Some of these islands have permanent residents and are frequented by tourists, who also require attention from the health surveillance authorities.

### **Acknowledgements**

To José Luiz Filho, Valmir Ortiz da Silva and José do Porto dos Santos from the Núcleo de Entomologia de Porto Rico for their assistance in collecting sandflies. To Professor Doctor Mônica Lúcia Gomes, from Laboratório de Doença de Chagas

(Universidade Estadual de Maringá), for the donation of the *T. cruzi* epimastigote DNA.

### **Author Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

### **Financial Support**

This work was supported by the Brazilian agency ‘Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)’.

### **References**

- Brasil. Ministério da Saúde [homepage on the Internet]. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. 2015a [cited 2017 May]. Available from: <https://goo.gl/GMqEqX>.
- Brasil. Conselho Regional de Medicina Veterinária - PR [homepage on the Internet]. Manual Técnico de Leishmanioses Caninas: Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. 2015b [cited 2017 October 2]. Available from: <https://goo.gl/9VEqct>.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2017. In: Ministério da Saúde [Internet]. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. Brasília: Ministério da Saúde. Available at: <https://goo.gl/aePdoM>. Accessed May, 2017.
- Córdoba-Lanús E, Grosso ML, Piñero JE, Valladares B, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98:1-5.
- Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. In: E.F. Rangel and R. Lainson (eds.) *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003:23-206.
- Hoffmann AR, Navarro IT, Junior VEC, Caldart ET, et al. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil - relato de caso. *Semina: Ciênc Agrár* 2012; 33:3265-3270.

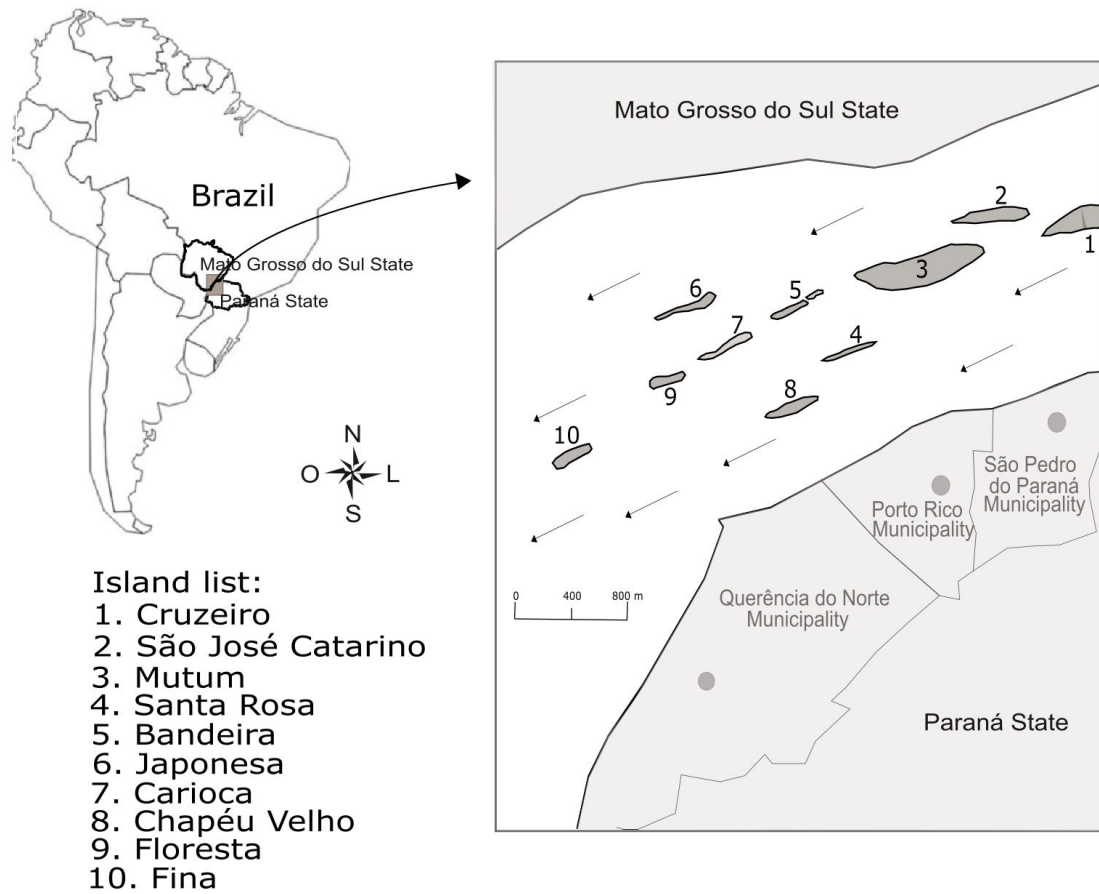
- Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol* 2002; 11:117-122.
- Loxdale HD, Lushai G. Molecular markers in entomology. *Bull Entomol Res* 1998; 88: 577-600.
- Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol news* 2007; 118:351-356.
- Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:1093-1097.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, et al. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44:255-259.
- Neitzke-Abreu HC, Reinhold-Castro KR, Venazzi MS, Scodro RBL, et al. Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by Multiplex Polymerase Chain Reaction, in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2014; 56:391-395.
- Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, Legriffon CMO, et al. 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* 2011; 11:137-143.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, et al. 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* 2009; 80:593-

595.

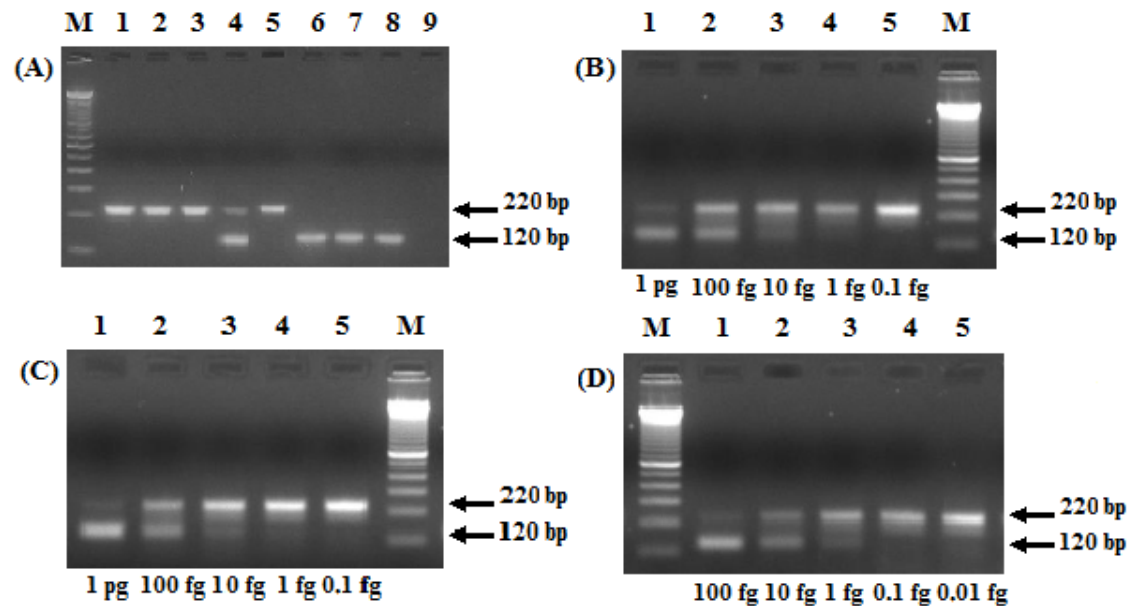
- Reinhold-Castro KR, Fenelon VC, Rossi RM, Brito JEC, et al. Impact of control measures and dynamics of sand flies in southern Brazil. *J vector ecol* 2013; 38:63-68.
- Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Cupolillo E, Toaldo CB, Macêdo VO, Fernandes O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 2001; 79:225–229.
- Saraiva L, Filho JDA, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:1033-1039.
- Santos BA, Reinhold-Castro KR, Cristóvão EC, Silveira TGV, Teodoro U. Sand flies on Paraná River Islands and natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* in southern Brazil. *J Vector Ecol* 2016; 41:186-189.
- Santos DR, Ferreira AC, Bisetto Junior A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:643-645.
- Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Lonardoni MVC, Dias MLGG, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R. An Autochthonous Case of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85:475-476.
- Teodoro U, Santos DR, Santos AR, Oliveira O, Poiani LP, Silva AM, Neitzke HC, Monteiro WM, Lonardoni MVC, Silveira TGV. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. *Rev Saúde Públ* 2006; 40:327-330.
- Trench FJP, Ritt AG, Gewehr TA, de Souza Leandro A, et al. First Report of



Autochthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. *Ann Clin Cytol Pathol* 2016; 2:1041.



**FIG. 1.** Islands of Paraná River where sandflies were collected, the municipalities of São Pedro de Paraná, Porto Rico and Querência do Norte, state of Paraná, southern Brazil.



**FIG. 2.** Multiplex PCR in 3% of agarose gel showing fragments of 120-bp and 220-bp. The fragment of 120-bp from the kDNA mini circle region of genus *Leishmania* were amplified with A1 and A2 primers. The fragment of 220-bp from the IVS6 *cacophony* gene region of the insects of genus *Lutzomyia* were amplified with 5Llcac and 3Llcac primers. (A) lane 1, 2 and 3, DNA samples of female sandflies; lane 4, positive control [DNA from male sandflies and DNA from *L. (V.) braziliensis* promastigotes]; lane 5, negative control (DNA from male sandflies); lane 6, positive control [DNA from *L. (V.) braziliensis* promastigotes]; lane 7, positive control [DNA from *L. (L.) amazonensis* promastigotes]; lane 8, positive control [DNA from *L. (L.) infantum* promastigotes]; lane 9, negative control (all reagents without DNA). M, 100-bp molecular marker (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil); (B) multiplex PCR showing the limit detection of DNA from *Leishmania (Viannia) braziliensis*; (C) multiplex PCR showing the limit detection of DNA from *Leishmania (Leishmania) infantum*; (D) multiplex PCR showing the limit detection of DNA from *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

**Artigo 2: “PREDOMINANCE OF *Nyssomyia neivai* (Pinto) ON THE ISLANDS OF  
THE PARANÁ RIVER, SOUTHERN BRAZIL”**

B A Santos  
Departamento de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde  
Universidade Estadual de Maringá  
Av. Colombo 5790, Maringá,  
Paraná State, Brazil. 87020-900  
Tel.: 55 44 3011 4564  
E-mail: baandreo@hotmail.com

**Predominance of *Nyssomyia neivai* (Pinto) on the islands of the Paraná River,  
Southern Brazil**

1 **ABSTRACT** Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by the protozoan  
2 *Leishmania* and it is one of the six most important infectious diseases in the world. The  
3 aim of this study was to conduct a research on the fauna and most frequented ecotopes  
4 by sandflies on islands of the Paraná River. The sandflies were collected with Falcão  
5 light traps in ten islands in the municipalities of São Pedro do Paraná, Porto Rico and  
6 Querência do Norte, in Paraná State, Brazil, from November 2012 to November 2014.  
7 A total of 76,145 specimens of *Ny. Neivai*, the only species found, were collected, of  
8 which 63,015 were female and 13,130, male. The largest number of sandflies was  
9 collected mainly in domiciles and peridomiciles. The islands of the Paraná River  
10 showed predominance of *Ny. neivai*, which is largely involved in the transmission of  
11 *Leishmania* and a risk of human leishmaniasis to the island inhabitants and tourists.  
12 **KEY WORDS** leishmaniasis, disease vectors, Psychodidae, zoonoses, epidemiology.

13

14

### Introduction

15 Leishmaniasis is a vector-borne disease, caused by the protozoan *Leishmania*,  
16 which is transmitted by the bite of infected female sandflies. It is considered a public  
17 health problem worldwide, mostly in the tropical and subtropical regions (WHO 2018).  
18 The epidemiology of tegumentary leishmaniasis (TL) in America is a complex issue,  
19 with different species of sandfly vectors, reservoir hosts, clinical manifestations,  
20 response to therapy and *Leishmania* species in the same geographical area (Brasil  
21 2017a). This disease is related to poverty and environmental changes, such as  
22 deforestation, the building of dams and urbanization, among others (WHO 2018). These  
23 changes promote greater distribution of species and geographic interposition of areas  
24 with different clinical forms and vectors.

25

26 TL is one of the six most important infectious diseases in the world. In Brazil,  
between 1990 and 2016, 687,780 cases were reported (Brasil 2017b), highlighting the

27 high endemicity of TL. In the Southern region, 14,967 cases were reported, from which  
28 14,217 (94.9%) were in the Paraná State (Brasil 2017b). In this state, *Nyssomyia*  
29 *whitmani* (Antunes and Coutinho), *Ny. neivai*, *Migonemyia migonei* (França), *Pintomyi*  
30 *apessoai* (Coutinho and Barretto) and *Pintomyia fischeri* (Pinto), which are sandflies  
31 species important in the epidemiology of TL (Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2010), are  
32 always collected in most localities. However, it should be taken into account the  
33 increase of visceral leishmaniasis (VL) cases in the last two decades in the states of  
34 Mato Grosso do Sul and São Paulo, which border Paraná state.

35         Considering the presence of TL cases in the islands and region, and visceral  
36 leishmaniasis (VL) cases in the states of Mato Grosso do Sul and São Paulo, and the  
37 importance of the knowledge on vector fauna and behavior in different ecotopes, the  
38 aim of this study was to describe sandfly abundance, distribution and most frequented  
39 ecotopes on the islands of the Paraná River, in Paraná State, Brazil.

40

41

## Materials and Methods

42         **Area of study.** Sandflies were collected on ten islands located in the  
43 municipalities of São Pedro do Paraná, Porto Rico and Querência do Norte, Paraná  
44 State, which border with the states of Mato Grosso do Sul and São Paulo, endemic  
45 regions for VL (Almeida et al. 2013). These islands are part of a complex with more  
46 than 70 islands situated within the Environmental Protection Area of Islands and  
47 Lowlands of the Paraná River, all of them in the middle stretch of the Upper Paraná  
48 River in northwestern Paraná and close together. Mutum, Bandeira, Chapéu Velho,  
49 Japonesa, Santa Rosa and Carioca islands are located in the municipality of Porto Rico  
50 (22°46'S and 53°16'W); Fina and Floresta islands, in the municipality of Querência do  
51 Norte (23°05'S and 53°29'W); and São José Catarino and Cruzeiro islands, in the  
52 municipality of São Pedro do Paraná (22°49'S and 53°13'W), all in Paraná State

53 (Figure 1). The distance of the studied islands from Mato Grosso do Sul range from 150  
54 to 2,500 meters and, in relation to Paraná, from 320 to 1,400 meters. The climate in  
55 these localities is humid subtropical mesothermal, with hot summers and with a  
56 tendency to wards concentrated rainfall and occasional frosts in winter (Leli and Assine  
57 2015). The information about the islands characteristics was previously described by  
58 Santos et al. 2016.

59 **Collection and identification of sandflies.** The sandflies were collected in  
60 domicile (residence), peridomicile (shelters of domestic animals) and extradomicile  
61 (forest) with Falcão light traps, in the following islands: Japonesa, Mutum, Santa Rosa,  
62 Carioca, Floresta, São José Catarino, Fina, Bandeira, Cruzeiro and Chapéu Velho  
63 (Table 1). On Mutum Island, the collections were performed once a month, from 18:00  
64 to 06:00 h, from November 2012 to November 2014, totaling 156 hours per trap. On the  
65 majority of the other islands, a collection was carried out in each season of the year,  
66 from 19:00 to 07:00 h, from November 2012 to October 2014, totaling 48 hours in each  
67 of these ecotopes. The total trap-hours differed on three islands: Carioca Island, a total  
68 of 5 hours per trap; on Fina Island, 12 hours per trap; and on Bandeira Island, 29 hours  
69 per trap (Table 1).

70 The collected sandflies were prepared and identified following Oliveira et al.  
71 2011 and according to the morphological characteristics of each species (Galati et al.  
72 2017, Galati 2017). The nomenclature followed Galati 2003, Galati et al. 2017 and  
73 Galati 2017, and abbreviations followed Marcondes 2007.

74

75

## Results

76 A total of 76,145 (HM 1,297.45) specimens of *Ny. neivai*, the only species found,  
77 were collected, of which 63,015 (83%) (HM 1,072.52) were female and 13,130 (17%)  
78 (HM 224.93) male (Table 1). The numerical data listed below are shown in Table 1.



79 The largest hourly mean (HM) of collected *Ny. neivai* was 329.09 on Japonesa  
80 Island, especially in a kennel (peridomicile) (HM 282.87). On Mutum Island, the largest  
81 number of sandflies (36,654) was collected and the HM was 234.94, collected mainly in  
82 a residence (domicile) (HM 101.24). On Santa Rosa Island, *Ny. neivai* (HM 199.69)  
83 was collected mainly in the interior of the forest (HM 62.44). On Carioca Island, the  
84 HM was 188.80, where the largest collection was at the forest edges (HM 81.80) and in  
85 a pigsty (HM 61.60). On Floresta Island, HM was 93.72, where the largest collection  
86 was in a henhouse (HM 35.68) and in a residence (HM 34.18). Of the total of *Ny. neivai*  
87 on São José Catarino Island (HM 72.92), the majority (HM 34.20) was also in a pigsty.  
88 On Fina Island, the HM of *Ny. neivai* was 65.81, with HM 23.83 in the forest edge. On  
89 Bandeira, Cruzeiro and Chapéu Velho islands, the HM was, respectively, 54.13  
90 (residence HM 36.37), 41.85 (residence HM 15.83) and 16.50 (hen-roost HM 9.39).

91 Most specimens of *Ny. neivai* were collected at residences and in domestic  
92 animal shelters on the islands, in the following proportions: Japonesa 100% (HM  
93 329.09), Mutum 92% (HM 216.08), Bandeira 90% (HM 48.89), Chapéu Velho 89%  
94 (HM 14.63), Floresta 80% (HM 74.88), Cruzeiro 78% (HM 32.69), São José Catarino  
95 63% (HM 46.22), Fina 63% (HM 41.65), Santa Rosa 61% (HM 122.07) and Carioca  
96 56% (HM 107.00).

97

98

### Discussion

99 In Brazil, the distribution of sandflies in the different municipalities of the Paraná  
100 State shows a diverse fauna, in which the *Ny. neivai* species predominates in several  
101 ecotopes (Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2010). Santos et al. (2016) collected only  
102 three species of this insect, *Ny. neivai* (19,818), *Ny. whitmani* (two specimens) and  
103 *Psathyromyia shannoni* (Dyar) (one specimen) on four islands of the Paraná River, with  
104 99.9% of *Ny. neivai*. In the present study, 100% of the collected sandflies were *Ny.*

105 *neivai*, suggesting that this species is very well adapted to the islands on the Paraná  
106 River. The variation of density and species of this Diptera in different ecotopes or  
107 localities is linked to the richness of mammal and bird fauna, to the presence of  
108 remaining forests, temperature, rainfall, soil type and to the degree of degradation of  
109 areas where TL is endemic (Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2010).

110 Correa (1998) analyzed soil use in the Mutum-Porto Rico archipelago (to which  
111 Mutum Island belongs) during five decades. Human occupation began around 1950 and  
112 the islands were intensively settled and modified in the 1960s. A soil-use map published  
113 in 1952 shows a predominance of dense arboreal vegetation (86.25% of total area); a  
114 similar map from 1996 shows that this vegetation type covered only 10.19% of the total  
115 area. By 2010, some natural revegetation had occurred in the archipelago, with arboreal  
116 vegetation occupying 78.00% of the area. Between 1964 and 1966, Mutum Island  
117 contained 31 residences, while in 1983, 96 residences and 258 inhabitants were present  
118 in the archipelago; presently, Mutum has only ten inhabitants. In 1998 a hydroelectric  
119 plant began operating, drastically changing the dynamics of the Paraná River, mainly  
120 the water level, which affected the quality of life of the residents and the soil use in the  
121 following years (Castro et al. 2014). Although records were found for only one of the  
122 islands studied here, the history of changes in land use and water regime may explain  
123 the present impoverished sandfly fauna.

124 In several municipalities of the state of Paraná, *Ny. neivai* has been collected in  
125 large numbers in domestic animal shelters in the peridomicile, where they find shelter  
126 and available blood sources (Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2010), as well as on the  
127 studied islands. On Japonesa Island, the largest HM was collected, especially in a kennel  
128 (peridomicile), probably due to the proximity of the forest and the presence of shrubs  
129 and remains of food and waste from dogs. On Mutum Island, the largest number of  
130 collected sandflies was in a residence (domicile), approximately 20 meters away from

131 the hen-roost and hen house, which may explain the great number of sandflies in the  
132 residence; the higher number of sandflies in the hen-roost in relation to the hen house  
133 can be explained by the larger number of hens that look for shelter at night. On Santa  
134 Rosa Island the same relation between number of sandflies in hen-roost and hen  
135 house was found, probably for the same reason. The collection on Carioca Island  
136 highlighted the number of sandflies in a pigsty, mainly because it is the only animal  
137 shelter where sandflies were collected. Similar situations were found in other islands,  
138 however, with fewer insects collected.

139 The studied islands are situated within the Environmental Protection Area of  
140 Islands and Lowlands of the Paraná River. The environmental protection regulations do  
141 not allow the occupation of the islands by the population; nevertheless, they are  
142 seasonally occupied by fishermen. It should be remembered that the *Ny. neivai* species  
143 is largely involved in the transmission of *Leishmania* in the Brazilian territory (Saraiva  
144 et al. 2009, Marcondes et al. 2009), including in the state of Paraná (Oliveira et al. 2011,  
145 Neitzke-Abreu et al. 2014). An irregular occupation of areas, such as the studied islands,  
146 may influence the number of sandflies collected, since the residents take with them their  
147 domestic animals, a source of blood for sandflies that can lead to insect population  
148 increase, a risk to the inhabitants and occasional tourists. This situation with risk of  
149 transmission of *Leishmania* may occur in other regions or countries, when people live in  
150 areas close to forests, especially where TL is endemic (Rotureau et al 2006, Gonçalves  
151 et al. 2016).

152 The proportions of *Ny. neivai* detected in residence and domestic animal shelters  
153 on the studied islands show clearly the same behavior of the sandflies found in several  
154 municipalities of the Paraná State (Silva et al. 2008, Teodoro et al. 2006, Teodoro et al.  
155 2010). Silva et al. (2008) collected 38,662 sandflies from 23 species in 87  
156 municipalities in the Paraná State, of which 75.06% were *Ny. neivai*. Teodoro et al.

157 (2006) found, in eight of ten municipalities of the same state, 68.38% (1,629 specimens)  
158 of *Ny. neivai* from the ten collected species. In another study, Teodoro et al. (2010)  
159 collected 27,441 sandflies of 13 different species in 19 municipalities in Paraná,  
160 showing that *Ny. neivai* predominated in eight municipalities, representing 73.83%  
161 (5,996) of the collected sandflies.

162           Therefore, the multiplex PCR was standardized, enabling determination  
163 of the infection rate of sandflies by members of the genus *Leishmania* in a single  
164 analysis, with certainty that the material analyzed is suitable for PCR. Moreover, the  
165 multiplex PCR is particularly useful when a large number of sandflies has to be  
166 analyzed, like in this research. Although no natural infection of *Ny. neivai* by  
167 *Leishmania* was found in this study, the interaction of sandflies with *Leishmania* and its  
168 natural reservoirs continues in these Paraná River islands, despite the low diversity of  
169 the sandfly fauna. Some of these islands have permanent residents and are frequented  
170 by tourists, who also require attention from the health surveillance authorities.

171           *Ny. neivai* predominates almost absolutely in the islands where the sandflies  
172 collections were made, characterizing the success of this species in its adaptation to the  
173 islands of the Paraná River. The sandflies were collected mainly in residences and  
174 domestic animal shelters, showing a similar behavior to that observed in different  
175 municipalities of the Paraná State. This species is involved in the transmission of  
176 *Leishmania*, which is a risk of human leishmaniasis to the island inhabitants and  
177 tourists. Since the studied islands are part of a complex with more than 70 islands in the  
178 Paraná River, the adaptation of sandflies to this large insular landscape needs to be  
179 further investigated to verify the predominant species in other islands.

180

181

### **Acknowledgements**

182           To José Luiz Filho, Valmir Ortiz da Silva and José do Porto dos Santos, from the

183 Núcleo de Entomologia de Porto Rico, for their assistance in collecting sandflies.

184

#### 185 **Financial support**

186 This work was supported by the Brazilian agency 'Coordenação de  
187 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES).

188

#### 189 **References Cited**

190 **Almeida, P. S., A. Sciamarelli, P. M. Batista, A. D. Ferreira, J. Nascimento, J.**

191 **Raizer, J. D. A. Filho, and R. G. Gonçalves. 2013.** Predicting the geographic

192 distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral

193 leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*

194 108: 992-996.

195 **Brasil. Ministério da Saúde. 2017a.** In: Ministério da Saúde [Internet]. Manual de

196 vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde. Available

197 at: <https://goo.gl/Gb87eb>. Accessed September, 2017.

198 **Brasil. Ministério da Saúde. 2017b.** In: Ministério da Saúde [Internet]. Casos

199 confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades

200 Federadas. 1990 a 2016. Brasília: Ministério da Saúde. Available at:

201 <https://goo.gl/aePdoM>. Accessed May, 2017.

202 **Castro, P. H.M., P. R. S. Vendrame, O. C. P. Neto, G. T. Correa, and J. P. P.**

203 **Pinese. 2014.** Evolução do Uso do Solo no Arquipélago Mutum-Porto Rico, Alto

204 Rio Paraná, no período de 2000 - 2010. *RBGf.* 7: 1153-1164.

205 **Correa, G. T. 1998.** O uso do solo no arquipélago Mutum-Porto Rico-alto rio Paraná,

206 (PR/MS). Maringá: Universidade Estadual de Maringá.

207 **Galati, E. A. B. 2003.** Morfologia e Taxonomia. In: E.F. Rangel and R. Lainson (eds.)

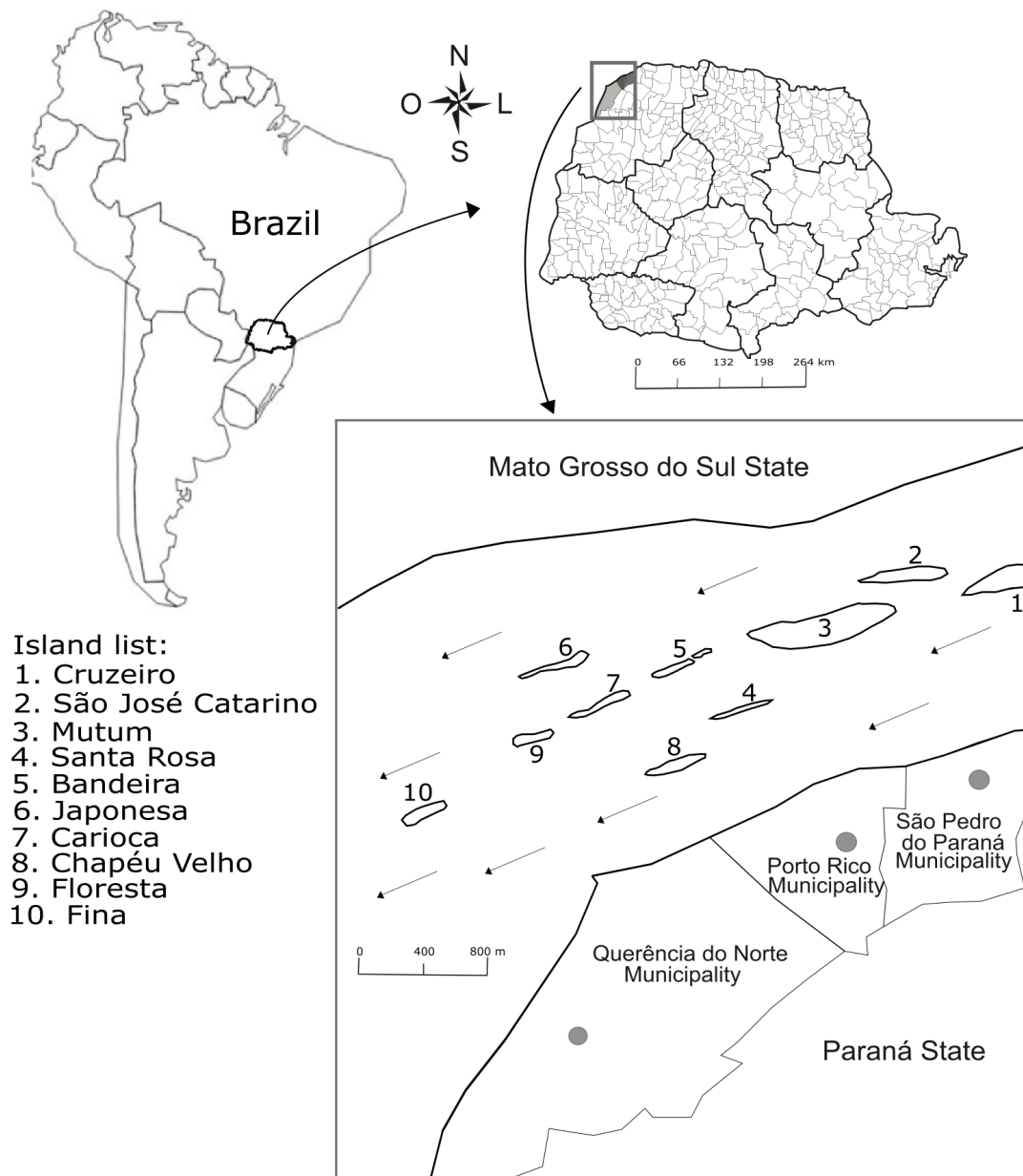
208 *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro, Fiocruz: 23-206.

- 209 **Galati E. A. B., Galvis-Ovallos, F., Lawyer, P., Nicole Léger, and J. Depaquit. 2017.**  
210 An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of  
211 Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Parasite, 24, 26
- 212 **Galati, E. A. B. 2017.** Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classificação,  
213 morfologia, terminologia e identificação de Adultos, Apostila – Disciplina  
214 PSP5127-1 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Public Health School.  
215 University of São Paulo, [www.fsp.usp.br/~egalati](http://www.fsp.usp.br/~egalati). Accessed April, 2018.
- 216 **Gonçalves, R., D. C. Soares, R. J. P. S. Guimarães, W. S. Santos, G. C. R. Sousa, A.**  
217 **P. Chagas. L. M. Garcez. 2016.** Diversity and ecology of sand flies  
218 (Psychodidae: Phlebotominae): foci of cutaneous leishmaniasis in Amazon  
219 Region, Brazil. Rev Pan-AmazSaude. 7 (esp): 133-142.
- 220 **Leli, I. T., and M. L. Assine. 2015.** Gênese, evolução e geomorfologia das ilhas e  
221 planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. M.S. thesis, Universidade  
222 Estadual de Maringá, Paraná, Brazil. doi: 10.13140/RG.2.1.4981.1608.
- 223 **Marcondes, C. B. 2007.** A proposal of generic and subgeneric abbreviations for  
224 phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world.  
225 Entomol. News. 118: 351-356.
- 226 **Marcondes, C. B., I. A. Bittencourt, P. H. Stoco, I. Eger, E. C. Grisard, and M.**  
227 **Steindel. 2009.** Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera:  
228 Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. Trans. R.  
229 Soc. Trop. Med. Hyg. 103: 1093-1097.
- 230 **Neitzke-Abreu, H. C., K. R. Reinhold-Castro, M. S. Venazzi, R. B. L. Scodro, A. C.**  
231 **Dias, T. G. V. Silveira, U. Teodoro, and M. V. C. Lonardoni. 2014.** Detection  
232 of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by  
233 multiplex polymerase chain reaction, in southern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 56:  
234 391-395.

- 235 **Oliveira, D. M., K. R. Reinhold-Castro, M. V. Z. Bernal, C. M. O. Legriffon, M. V.**  
236 **C. Lonardoni, U. Teodoro, and T. G. Silveira. 2011.**Natural infection of  
237 *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the state of Paraná, southern  
238 Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. Vector Borne Zoonotic  
239 Dis. 11: 137-143.
- 240 **Rotureau B, P. Gaborit, J. Issaly, R. Carinci, F. Fouque, B. Carme. 2006.**Diversity  
241 and ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coastal  
242 French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 1: 62-69.
- 243 **Santos, B. A., K. R. Reinhold-Castro, E. C. Cristóvão, T. G. V. Silveira, and U.**  
244 **Teodoro. 2016.**Sand flies on Paraná River Islands and natural infection of  
245 *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* in southern Brazil. J. Vector. Ecol. 41: 186-189.
- 246 **Saraiva, L., G. M. L. Carvalho, C. M. F. Gontijo, P. F. Quaresma, A. C. V. M. R.**  
247 **Lima, A. L. Falcão, and J. D. Andrade Filho. 2009.**Natural infection of  
248 *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania*  
249 *infantum chagasi* in Brazil. J. Med. Entomol. 46: 1159-1163.
- 250 **Silva, A. M., N. J. Camargo, D. R. Santos, R. Massafra, A. C. Ferreira, C. Postai,**  
251 **E. C. Cristóvão, J. F. Konolsaisen, J. R. A. Bisetto, R. Perinazo, U. Teodoro**  
252 **and E. G. B. Galati. 2008.** Diversidade, distribuição e abundância de  
253 flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado do Paraná, sul do Brasil.  
254 Neotrop. Entomol. 37: 209-225.
- 255 **Teodoro, U., D. R. Santos, A. R. Santos, O. Oliveira, L. P. Poiani, A. M. Silva, H.**  
256 **C. Neitzke, W. M. Monteiro, M. V. C. Lonardoni, and T. G. V. Silveira. 2006.**  
257 Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. Rev. Saúde  
258 Pública. 40: 327-330.
- 259 **Teodoro, U., D. R. Santos, A. M. Silva, R. Massafra, L.E. Imazu, W.M. Monteiro,**  
260 **and H. C. Neitzke-Abreu. 2010.** Fauna de Flebotomíneos em Municípios do

- 261 Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. Rev. Pat. Trop. 39: 322-330.
- 262 **WHO - World Health Organization. 2018.** [homepage on the Internet].
- 263 Leishmaniasis. Magnitude of the problem. Available at: <https://goo.gl/6jzdCT>.
- 264 Accessed January, 2018.





265

266 **Figure 1.** Islands of Paraná River where sandflies were collected, the municipalities of

267 São Pedro de Paraná, Porto Rico and Querência do Norte, state of Paraná, southern

268 Brazil.

269 **Table 1.** Hourly mean (HM) of sandflies of the *Nyssomyia neivai* species collected in the  
 270 Paraná River islands, State of Paraná, Brazil, from 2012 to 2014

Locality/ Ecotope	Gender	Residence <sup>1</sup>	Kennel <sup>2</sup>	Hen-roost <sup>2</sup>	Hen house <sup>2</sup>	Pigsty <sup>2</sup>	FE <sup>3</sup>	IF <sup>3</sup>	Total HM
Japonesa	♂	2.43	55.75	-	2.89	-	0	0	61.07
	♀	32.82	227.12	-	8.08	-	0	0	268.02
HM Subtotal		35.25	282.87	-	10.97	-	0	0	329.09
Total*		1,692	13,578	-	527	-	0	0	15,797
Mutum	♂	13.28	-	11.87	3.04	1.57	1.31	0.25	31.32
	♀	87.96	-	64.00	27.59	6.77	14.97	2.33	203.62
HM Subtotal		101.24	-	75.87	30.63	8.34	16.28	2.58	234.94
Total*		15,794	-	11,836	4,778	1,301	2,541	404	36,654
Santa Rosa	♂	3.73	-	8.48	6.83	-	1.68	34.21	54.93
	♀	27.16	-	42.58	33.29	-	13.50	28.23	144.76
HM Subtotal		30.89	-	51.06	40.12	-	15.18	62.44	199.69
Total*		1,483	-	2,451	1,926	-	729	2,997	9,586
Carioca	♂	0	-	-	-	5.4	7.40	0	12.80
	♀	40.00	-	-	-	61.6	74.40	0	176.00
HM Subtotal		40.00	-	-	-	67.00	81.80	0	188.80
Total*		200	-	-	-	335	409	0	944
Floresta	♂	4.54	-	0.84	4.83	-	2.97	0.71	13.89
	♀	29.64	-	4.18	30.85	-	9.75	5.41	79.83
HM Subtotal		34.18	-	5.02	35.68	-	12.72	6.12	93.72
Total*		1,641	-	241	1,713	-	611	294	4,500
São José Catarino	♂	0.69	-	-	2.08	11.35	6.02	3.85	23.99
	♀	4.06	-	-	5.19	22.85	12.00	4.83	48.93
HM Subtotal		4.75	-	-	7.27	34.20	18.02	8.68	72.92
Total*		228	-	-	349	1,642	865	417	3,501
Fina	♂	0	0.58	-	4.33	-	3.75	0.08	8.74
	♀	16.66	0.75	-	19.33	-	20.08	0.25	57.07
HM Subtotal		16.66	1.33	-	23.66	-	23.83	0.33	65.81
Total*		200	16	-	284	-	286	4	790
Bandeira	♂	6.93	1.82	-	0.96	-	0	0.17	9.88
	♀	29.44	5.18	-	4.56	-	0	5.07	44.25
HM Subtotal		36.37	7.00	-	5.52	-	0	5.24	54.13
Total*		1,055	203	-	160	-	0	152	1,570
Cruzeiro	♂	1.96	-	2.25	1.00	-	0.47	0.83	6.52
	♀	13.87	-	9.22	4.39	-	3.06	4.79	35.33
HM Subtotal		15.83	-	11.47	5.39	-	3.54	5.62	41.85
Total*		760	-	551	259	-	170	270	2,010
Chapéu Velho	♂	0.44	0.41	0.64	-	-	0.23	0.08	1.80
	♀	2.12	2.27	8.75	-	-	1.25	0.31	14.70
HM Subtotal		2.56	2.68	9.39	-	-	1.48	0.39	16.50
Total*		123	129	451	-	-	71	19	793

271 - Nonexistent; An asterisk indicates total number of sandflies collected; FE: forest edge;

272 IF: interior of the forest; <sup>1</sup>Domicile; <sup>2</sup>Peridomicile; <sup>3</sup>Extradomicile.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Artigo 1 - A PCR multiplex foi padronizada, permitindo a determinação da taxa de infecção de flebotomíneos por protozoários do gênero *Leishmania* em uma única análise, com a certeza de que o material analisado é adequado para PCR. Além disso, o PCR multiplex é particularmente útil quando um grande número de flebotomíneos tem que ser analisado, como nesta pesquisa. A infecção natural de *Ny. neivai* por *Leishmania* não foi detectada neste estudo. Contudo, não se descarta a interação de flebotomíneos com *Leishmania* e seus reservatórios naturais nestas ilhas do rio Paraná, apesar da baixa diversidade da fauna de flebotomíneos. As ilhas onde há residentes permanentes e são freqüentadas por turistas exigem atenção da vigilância sanitária.

Artigo 2 - *Ny. neivai* predomina quase absolutamente nas ilhas onde foram feitas as coletas de flebotomíneos, caracterizando o sucesso dessa espécie em sua adaptação às ilhas do rio Paraná. Os flebotomíneos foram coletados principalmente em residências e abrigos de animais domésticos, apresentando comportamento semelhante ao observado em diversos municípios do Estado do Paraná. A espécie *Ny. neivai* está envolvida na transmissão da *Leishmania*, mostrando que há risco de ocorrência leishmaniose para os habitantes das ilhas e turistas. Como as ilhas onde os flebotomíneos foram coletados fazem parte de um complexo com mais de 70 ilhas no rio Paraná, comportamento destes insetos em outras ilhas deve ser investigado, para que as medidas de controle que venham a ser aplicadas sejam efetivas.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

O fato de não ter sido detectada a infecção natural de *Ny. neivai* por *Leishmania* spp. indica a importância da continuidade desta pesquisa para auxiliar os serviços de vigilância sanitária no que tange ao conhecimento do risco de ocorrência de LT em ilhas do rio Paraná, uma vez que estas ilhas são frequentadas por pescadores e turistas. Daí a necessidade da existência de serviço especializado de entomologia médica nos departamentos de saúde dos municípios, para o monitoramento da densidade populacional de vetores da LT e de outras doenças, a exemplo da dengue, malária e esquistossomose, nos municípios onde há ambiente favorável à ocorrência das mesmas.