

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

HERINTHA COETO NEITZKE-ABREU

Leishmaniose tegumentar: influência de alterações ambientais na frequência de flebotomíneos e detecção de *Leishmania*

Maringá
2013

HERINTHA COETO NEITZKE-ABREU

Leishmaniose tegumentar: influência de alterações ambientais na frequência de flebotomíneos e detecção de *Leishmania*

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

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni

Maringá
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

N417L Neitzke-Abreu, Herintha Coeto
Leishmaniose tegumentar : influência de alterações ambientais na frequência de flebotomíneos e detecção de *Leishmania* / Herintha Coeto Neitzke- Abreu. -- Maringá, 2013.
89 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

1. *Leishmania*. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. Flebotomíneo. 4. Polymerase Chain Reaction (PCR). I. Lonardoni, Maria Valdrinez Campana, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed. 616.9364

AMMA-00657

FOLHA DE APROVAÇÃO

HERINTHA COETO NEITZKE-ABREU

Leishmaniose tegumentar: influência de alterações ambientais na frequência de flebotomíneos e detecção de *Leishmania*

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Mara Valdrinez Campana Lonardoni
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Anita Hilda Straus Takahashi
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ione Parra Barbosa Tessmann
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Terezinha Inez E. Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressati Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 05 de abril de 2013.

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus
pais e ao meu esposo pelo
imensurável incentivo.
Obrigada pelo apoio
que me foi dispensado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proteger abrindo e fechando as portas que surgem em meu caminho e por guiar os meus passos. Sou grata por me fortalecer e proteger. Que Seu nome seja louvado através da minha vida!

Aos meus pais, Herton Neitzke e Diva Coeto Neitzke, pela dedicação e incentivo durante toda a minha vida. Vocês nunca mediram esforços para alcançar o meu sucesso. Foram vários os dias em que choraram e riram comigo pelo cansaço dos experimentos. Mãe, obrigado por me acompanhar ao laboratório em diversas noites e feriados. Vocês são minhas inspirações!

Ao meu esposo, Marcelo Cordeiro de Abreu, que suportou minha ausência e nunca deixou de me apoiar. Obrigado pelo amor e compreensão. Você é meu pilar!

À minha irmã Helintha Coeto Neitzke e minha tia Doracy Cueto Donha, que suportaram minha ansiedade e nunca deixaram de sonhar comigo. Obrigado pelas orações e amizade. Vocês estarão sempre no meu coração!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez Campana Lonardoni, pela dedicação e pelo conhecimento transmitido. Obrigado por ter acreditado... Meu muito obrigado!

À Prof^a. Dr^a. Thaís Gomes Verzignassi Silveira, pela competência e pelos ensinamentos. Obrigado pela confiança.

Ao Prof. Dr. Ueslei Teodoro, por abrir as portas da minha vida profissional. Você foi fundamental para a solidificação deste caminho. Meu mestre!

À todos os meus familiares, pelas orações e carinho.

Aos professores e pesquisadores Drs. Jorge Juarez Vieira Teixeira, Maria Dalva de Barros Carvalho e Sandra Mara Alessi Aristides, pela atenção.

À amiga e companheira de bancada e de longas conversas, Kárin Rosi Reinhold de Castro, pelo apoio, amizade, seriedade, esforço e disposição. Como é bom ter pessoas comprometidas com Cristo ao nosso lado.

Aos colegas de trabalho, Camila Alves Mota, Fernanda Vagetti, Marcos Vinícius Zandonadi Bernal, Mateus Sabaini Venazzi, Naielly Rodrigues Silva e Rhuan Carlos Souza Caetano, pela ajuda incansável.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia Clínica, Ivone Alves, Marina Marlede Gobbi, Paulo Donizeti Zanzarini e Zilda dos Anjos Guimarães, e do Laboratório de Parasitologia Clínica, Eneide Aparecida Sabaini Venazzi, pelas risadas e colaboração.

À Olivia Abeche, pela paciência e testemunho.

Aos co-autores das publicações, pela colaboração.

Ao professores Drs. Rosilene Fressatti Cardoso e Wuelton Marcelo Monteiro, por terem participado da banca de qualificação, minha gratidão.

Ao professores Drs. Anita Hilda Straus Takahashi, Dennis Armando Bertolini, Ione Parra Barbosa Tessmann e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, por terem aceitado participar da banca de defesa, meu respeito e gratidão.

Às amigas, Barbara Andreo dos Santos, Carol Cella Conter, Izabel Galhardo Demarchi, Jaqueline de Carvalho Gasparotto, Thaís Regina Ranucci e Neide Moreira, pelos momentos de descontração, pelas risadas e desabafos.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Obrigado pelos ensinamentos e convivência.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Obrigado pela companhia e pelos conhecimentos divididos.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

A realização deste sonho não teria se concretizado sem o apoio, estímulo e colaboração de cada um de vocês. Os meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o
propósito debaixo do céu...
tempo de plantar,
e tempo de arrancar o que se plantou”.

(Eclesiastes 3.1-2)

Leishmaniose tegumentar: influência de alterações ambientais na frequência de flebotomíneos e pesquisa de *Leishmania*

RESUMO

O grupo de doenças conhecidas como leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e têm ampla distribuição mundial. Estudos de flebotomíneos permitem avaliar a vulnerabilidade da endemia e desenvolver medidas de controle. Métodos laboratoriais devem ser avaliados a fim de melhorar o diagnóstico. O objetivo foi avaliar a fauna de flebotomíneos, a taxa de infecção natural por *Leishmania* e os efeitos de alterações ambientais sobre a densidade desses insetos. Também foi estimar a acurácia da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes suspeitos de leishmaniose tegumentar (LT) e relatar um caso atípico de LT. Flebotomíneos foram coletados em municípios do Paraná, com armadilhas de Falcão e Shannon, em diversas etapas. Foram feitas alterações no ambiente (peridomicílios e abrigos de animais domésticos) entre as etapas de coletas a fim de reduzir a frequência de flebotomíneos nas residências. Algumas fêmeas de flebotomíneos, após a dissecação e identificação das espécies, foram submetidas à multiplex-PCR para detecção de *Leishmania* (*Viannia*). Nas amostras de pacientes suspeitos de LT foram realizadas a PCR para detecção de *Leishmania* (*Viannia*). Após as alterações ambientais, os flebotomíneos foram coletados principalmente em abrigos de animais domésticos. Apesar de nenhuma das fêmeas dissecadas ter sido encontrada com flagelados, DNA de *Leishmania* (*Viannia*) foi detectado por multiplex-PCR em 0,46% de *Nyssomyia neivai* e 1,12% de *Nyssomyia whitmani*. Entre os pacientes com LT, 83,87%, 51,67%, 64,52%, 85,71% e 96,10% foram positivos na PCR de lesão (PCR-L), PCR de sangue (PCR-S), pesquisa direta do parasito, imunofluorescência indireta e intradermoreação de Montenegro, respectivamente. Em cinco pacientes, apenas a PCR-L foi positiva e em outros dois pacientes, apenas a PCR-S foi positiva. Observa-se a importância de manter o peridomicílio limpo, a fim de evitar a formação de criadouros de flebotomíneos. *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* são susceptíveis à infecção por *Leishmania*. A multiplex-PCR, devido à sua especificidade, sensibilidade e viabilidade, pode ser usada em estudos epidemiológicos para avaliar taxas de infecção natural. A PCR-L é indicada em pacientes com lesões crônicas ou reinfecção por *Leishmania*, que pode evoluir para a forma mucosa. A PCR-S é indicada em pacientes com resultados negativos em testes convencionais ou para pacientes sem lesão ou com lesões atípicas.

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

Cutaneous leishmaniasis: influence of environmental changes on the frequency of sandflies and detection of *Leishmania*

ABSTRACT

The group of diseases collectively known as leishmaniasis is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, and these occur worldwide. Studies of the sandfly vectors are useful to assess the vulnerability of hosts in endemic regions, and to develop control measures. Laboratory methods should be evaluated to improve the diagnosis. This study evaluated the sandfly fauna, the natural infection rate of sandfly species by *Leishmania*, and the effects of environmental changes on the density of these insects. Also, the accuracy of the polymerase chain reaction (PCR) technique in diagnosing patients suspected of cutaneous leishmaniasis (CL) was estimated. An atypical case of CL is reported. Sandflies were collected in municipalities of the state of Paraná, by means of Falcão and Shannon traps, during several stages of the study. Changes were made in the local environment (peridomestic and animal shelters) between collections, in order to reduce the frequency of sandflies in the domiciles. Some female sandflies, after dissection and identification of the species, were subjected to multiplex PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*). Samples from patients suspected of CL were examined by means of PCR, to detect *Leishmania* (*Viannia*). Subsequently to the environmental changes, the sandflies were collected mainly in domestic-animal shelters. Although none of the dissected females showed flagellates, DNA of *Leishmania* (*Viannia*) was detected by multiplex PCR in 0.46% of the specimens of *Nyssomyia neivai* and in 1.12% of the specimens of *Nyssomyia whitmani*. Among patients with CL, 83.87%, 51.67%, 64.52%, 85.71% and 96.10% were positive in the PCR of lesion (PCR-L), PCR blood (PCR-B), direct parasite search, Indirect Immunofluorescence and Montenegro skin test, respectively. In five patients only the PCR-L was positive, and in two other patients only the PCR-B was positive. It is important to keep the peridomestic environment clean in order to prevent the formation of sandfly breeding sites. *Ny. neivai* and *Ny. whitmani* are susceptible to infection by *Leishmania*. The multiplex PCR technique, because of its specificity, sensitivity and feasibility, can be used in epidemiological studies to assess natural infection rates. PCR-L is indicated in patients with chronic lesions or reinfection with *Leishmania*, which can progress to mucosal lesion. PCR-B is indicated in patients with negative results from conventional tests, or for patients without lesions or with atypical lesions.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania*. Sandflies. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 Distribution of Falcão traps in the different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil	39
Figure 2 Monthly rainfall and sand fly hourly mean numbers collected in all the traps in the different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007	40
Table 1 Sand flies collected in different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007	41
Table 2 Hourly mean number of sand flies collected in different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007	42
Table A Sandflies collected in Recanto Marista, Água Azul Farm, and Flor de Maio Grange, southern Brazil, from January to September, 2006	56
Figure A Multiplex PCR in 2% agarose gel showing fragments of 70-bp and 220-bp	57
Figure 1 Flow diagram of patients to estimate the accuracy of PCR in the diagnosis of CL...	74
Figure 2 PCR analytical sensitivity, showing 268-bp fragment of human β -globin gene region	75
Table 1 PCR-L and PCR-B results for 106 patients with CL, according to conventional test results	76
Table 2 Comparison of PCR-L, PCR-B, DS, IIF and MST in relation to time of evolution of lesions in patients with CL	77
Table 3 Performances of PCR-L, PCR-B, IIF and MST for laboratory diagnosis of CL	78
Figure 1 A) Manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar de paciente autóctone do estado do Paraná, após 7 meses da infecção inicial e antes do tratamento. B) Cicatrização das lesões cutâneas após 2 meses do tratamento	86

Figure 2 A) Pesquisa direta do parasito em material de escarificação de lesão, apresentando formas amastigotas características de *Leishmania* spp.; coloração de Giemsa analisada por microscopia óptica (aumento de 1000x). B) Gel de agarose mostrando o fragmento de 70-pb do kDNA de *Leishmania* (*Viannia*). C) Teste de intradermorreação de Montenegro (inoculação de 0,1 mL do antígeno) mostrando área de endurecimento de 8,0 mm de diâmetro 87

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Journal of Vector Ecology* (artigo 1) disponível em: <<http://goo.gl/wmJvu>>; *Acta Tropica* (artigo 2) disponível em: <<http://goo.gl/czbzd>>; *PLOS ONE* (artigo 3) disponível em: <<http://goo.gl/T4Y7X>>; *PLOS Neglected Tropical Diseases* (artigo 4) disponível em: <<http://goo.gl/Myw46>>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	13
1.1	Epidemiologia das leishmanioses	13
1.2	Leishmaniose tegumentar	14
1.3	O parasito	14
1.4	Diagnóstico	15
1.5	O vetor	16
1.6	Resposta Imune	18
1.7	Justificativa	20
1.8	Objetivos	20
1.9	Referências	21
2	CAPÍTULO II	31
2.1	Artigo 1: Alteration in frequency of sand flies in domiciles after changes in the peridomicile area, State of Paraná, Brazil	31
2.2	Artigo 2: Detection of <i>Leishmania (Viannia)</i> in <i>Nyssomyia neivai</i> and <i>Nyssomyia whitmani</i> by multiplex polymerase chain reaction, in southern Brazil	43
2.3	Artigo 3: Detection of DNA from <i>Leishmania (Viannia)</i> : accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis	58
2.4	Artigo 4: Leishmaniose tegumentar e manifestações clínicas atípicas	79
3	CAPÍTULO III	88
3.1	Conclusões	88
3.2	Perspectivas futuras	89

CAPÍTULO I

EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários. A forma da doença depende da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta imune do indivíduo, podendo manifestar-se como leishmaniose visceral (LV) que é a forma mais grave e ocorre disseminação crônica da infecção para o fígado, baço e medula óssea, podendo ser fatal se não tratada (WHO, 2010); e leishmaniose tegumentar (LT) também conhecida como úlcera de Bauru, que é uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas, podendo causar lesões desfigurantes (WHO, 2010).

As leishmanioses apresentam ampla distribuição mundial, com notificação em quatro continentes e são consideradas endêmicas em 98 países. Estima-se que afetam aproximadamente 14 milhões de pessoas e 350 milhões vivem sob o risco de contrair uma das formas da doença (WHO, 2013).

Mundialmente, a LV afeta cerca de 400 a 600 mil pessoas por ano, sendo que 90% desses casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2013). No Brasil, entre os anos de 1990 a 2011, foram registrados 68.689 casos de LV em 22 dos 27 estados (BRASIL, 2012a), com letalidade de aproximadamente 7%.

A LT acomete cerca de 1 a 1,5 milhões de pessoas por ano no mundo (WHO, 2013) e ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MARZOCHI, 1992). No Brasil, a LT tem sido notificada em todos os estados (BRASIL, 2012b). Entre os anos de 1990 a 2011 foram registrados 13.161 casos de LT na Região Sul do Brasil, dos quais 94,9% foram no estado do Paraná (BRASIL, 2012b), onde é endêmica, ocorrendo na maioria dos 399 municípios, sobretudo no norte e oeste do estado.

Antigamente, as leishmanioses eram consideradas zoonoses de animais silvestres e o homem era ocasionalmente acometido quando em contato com matas. Atualmente, as leishmanioses têm ampla distribuição geográfica, sendo relatada em áreas que não eram endêmicas anteriormente (DESJEUX, 2001). Ocorre em regiões urbanas e em zonas rurais com elevado grau de antropia (LIMA et al., 2002), onde a presença de animais domésticos em residências próximas à mata propicia um ambiente atrativo aos flebotomíneos vetores, facilitando a transmissão da *Leishmania* (CURTI et al., 2009). As leishmanioses também estão ligadas a mudanças ambientais, como o desmatamento, a construção de barragens, sistemas de irrigação e novas urbanizações, e a migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas (WHO, 2010).

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A LT é geralmente reconhecida pela forma cutânea, causando ulcerações que podem resultar em lesões desfigurantes. A lesão cutânea se desenvolve a partir de uma pápula inflamatória e ocorre, normalmente, em regiões não cobertas do corpo (face, braços e pernas). As lesões apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas: formato arredondado ou ovalado; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras (BRASIL, 2007). As lesões podem ser únicas ou múltiplas e costumam ser ulceradas. Se não tratadas, as lesões primárias tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas secundárias (BRASIL, 2007).

O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea primária ainda em atividade ou anos após sua cicatrização, variando de acordo com a predisposição imune do paciente (MARSDEN, 1986). A ocorrência da forma mucosa varia de 3 a 5% dos casos (BRASIL, 2007). No Paraná, 290 casos de LT foram relatados em 2010, com 67 (23,1%) casos de leishmaniose mucosa. Na forma mucosa, as lesões, que se desenvolvem destruindo cartilagens (AGUILAR et al., 1989; BRASIL, 2007) e são secundárias à lesão cutânea, aparecem devido a disseminação hematogênica ou linfática e atingem com mais frequência boca, nariz, laringe e faringe (DIETZE, 2003; FALQUETO, SESSA, 2005; MINODIER, PAROLA, 2006; PALHETA-NETO et al., 2008), apresentando um diagnóstico complexo e sendo de difícil tratamento (MARSDEN, 1986; BRACHO et al., 2007).

A diversidade de expressão clínica da doença é caracterizada em função da complexidade biológica do parasito, reservatórios, vetores, meio ambiente e hospedeiros, envolvendo a resposta imune desenvolvida contra o parasito (BÑNULS et al., 2011).

O conhecimento de manifestações atípicas de LT e o relato das suas diversas formas de apresentação são de fundamental importância para amenizar este importante problema de saúde pública.

O PARASITO

As leishmanioses são causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. Esses protozoários envolvem no seu ciclo de vida, vertebrados (mamíferos) onde se desenvolvem na forma amastigota e invertebrados (flebotomíneos) desenvolvendo-se na forma promastigota. A doença é determinada por

espécies pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

Diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis pelas diversas formas clínicas da doença. Várias espécies de *Leishmania* são descritas no mundo, porém no Brasil há relatos de sete espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lindenberg* e *L. (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2007). Em todo o território brasileiro e no estado do Paraná, os casos de LT são principalmente devido a *L. (V.) braziliensis*, cujas lesões, se não tratadas, podem resultar na forma mucosa (AGUILAR et al., 1989), daí a necessidade de acompanhamento destes pacientes.

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam uma mitocôndria única, denominada cinetoplasto, rico em DNA (kDNA). O kDNA é dividido em maxicírculo que contém os genes codificadores de enzimas mitocondriais, e minicírculo que estão presentes em milhares de cópias e apresentam regiões de sequências de base conservadas e regiões que variam entre as diferentes espécies (RODGERS et al., 1990), podendo ser útil na identificação da espécie.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LT abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (GONTIJO, CARVALHO, 2003). Os exames laboratoriais compreendem técnicas de detecção do parasito (pesquisa direta, isolamento em cultura, inoculação em animais, histopatologia) e técnicas imunológicas (avaliação da resposta imune celular, de anticorpos e do antígeno em imunocomplexos) (SALMAN et al., 1999).

O diagnóstico padrão da LT é realizado pela demonstração do parasito (GONTIJO, CARVALHO, 2003), porém, estes métodos apresentam limitações (RIDLEY et al., 1989). A histopatologia, que é uma técnica invasiva, e a pesquisa direta do parasito (PD), embora sejam métodos rápidos e de fácil realização, apresentam baixa positividade pois dependem da quantidade de parasito na amostra, tendo aplicação limitada em pacientes com lesões antigas ou em pacientes sem lesão (GONTIJO, CARVALHO, 2003). Além disso, a PD não informa a espécie de *Leishmania*.

Métodos de isolamento como a cultura e a inoculação em animais podem ser utilizados, porém, a eficácia varia conforme a espécie de *Leishmania* e há grande risco de contaminação bacteriana dos meios de cultura (VEXENAT et al., 1996). O uso de animais de experimentação é um procedimento complexo devido ao longo tempo necessário para a evolução da lesão (GONTIJO, CARVALHO, 2003), além dos aspectos éticos. Por estas

razões, a cultura e a inoculação em animais não estão disponíveis em uma rotina laboratorial de diagnóstico.

Testes sorológicos para pesquisa de anticorpos são frequentemente utilizados para o diagnóstico de LT. Porém, apesar da fácil realização, os métodos sorológicos apresentam algumas limitações, podendo ocorrer reação cruzada na doença de Chagas (VEXENAT et al., 1996; GONTIJO, CARVALHO, 2003), além de apresentar maior negatividade em pacientes com lesão única ou lesões até seis meses de evolução (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) tem sido relatada com alta positividade (VENAZZI et al., 2006; VENAZZI et al., 2007), porém em pacientes HIV positivos apresenta resultado falso negativo devido a ausência de resposta imunológica celular contra antígenos do parasito (GONTIJO, CARVALHO, 2003). Além disso, a IDRM é uma técnica invasiva e pode apresentar resultado positivo em infecção latente, além de não distinguir infecção passada de infecção atual (OLIVEIRA et al., 2005; VENAZZI et al., 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido avaliada na pesquisa de *Leishmania* em áreas endêmicas (SINGH et al., 2005) e oferece vantagens em relação aos testes convencionais, sendo mais específica, sensível, versátil e rápida (BELLI et al., 1998). Existe grande variação na sensibilidade da PCR, particularmente no que se refere à escolha dos oligonucleotídeos iniciadores e na amostra clínica utilizada (REITHINGER et al., 2000; VENAZZI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011b). A PCR tem sido utilizada em material de cultura (MARCUSI et al., 2008), lesão (BELLI et al., 1998; HARRIS et al., 1998; AVILES et al., 1999; ISAZA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; VENAZZI et al., 2006; FAGUNDES et al., 2010), sangue (GUEVARA et al., 1994; MATHIS, DEPLAZES, 1995; BELLI et al., 1998; REITHINGER et al., 2000; CÂMERA et al., 2006; VENAZZI et al., 2007) e flebotomíneos (NEITZKE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011a).

Foi sugerida uma combinação de diferentes metodologias para melhorar o diagnóstico de LT (SILVEIRA et al., 1999). Pacientes com suspeita de LT devem ser corretos e rapidamente diagnosticados, e em infecções por *Leishmania* é importante o acompanhamento dos pacientes pois pode ocorrer casos de disseminação e evoluir para a forma mucosa, potencialmente fatal. Portanto, há a necessidade de métodos mais sensíveis e que podem ser utilizados para controle de cura e acompanhamento dos pacientes.

O VETOR

As leishmanioses são transmitidas por dípteros pertencentes à subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos. O conhecimento sobre a fauna, o

comportamento e a taxa de infecção natural de flebotomíneos, bem como a identificação das espécies de *Leishmania* e as características ambientais de áreas endêmicas, são informações preciosas para proteger as populações que vivem em locais onde há leishmaniose e conhecer a vulnerabilidade da endemia nas áreas onde há risco de transmissão.

Os flebotomíneos têm ampla distribuição no Brasil (MARCONDES et al., 2005; COSTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010a; CARVALHO et al., 2010b) e as diferentes espécies predominam em diversas regiões, conforme a característica do ambiente (MEMBRIVE et al., 2004; TEODORO et al., 2006a; TEODORO et al., 2006b; SILVA et al., 2008; TEODORO et al., 2010; NEITZKE-ABREU et al., 2012).

Os flebotomíneos habitam em regiões de mata, porém têm sido encontrados em ambientes com elevado grau de antropia, devido às condições ambientais nitidamente favoráveis à transmissão de *Leishmania*. Aqui inclui o peridomicílio de zonas rurais e regiões urbanas (LIMA et al., 2002; MUNIZ et al., 2006; MONTEIRO et al., 2008) devido a presença de abrigos de animais domésticos construídos nas proximidades das habitações humanas e a precariedade das condições de higiene, propiciando a circulação de mamíferos silvestres e flebotomíneos (GOMES, NEVES, 1998; TEODORO et al., 2001a; TEODORO et al., 2001b; LIMA et al., 2002; NEITZKE-ABREU et al., 2012). Os trabalhos de reorganização e limpeza do peridomicílio e a desinsetização de edificações rurais, têm demonstrado diminuição da população de flebotomíneos no domicílio, em áreas endêmicas de LT (TEODORO et al., 2003; TEODORO et al., 2007; NEITZKE-ABREU et al., 2012).

Diversas espécies de flebotomíneos são descritas (RANGEL, LAISON, 2003; MEMBRIVE et al., 2004; MUNIZ et al., 2006; TEODORO et al., 2006b; NEITZKE et al., 2008; REINHOLD-CASTRO et al., 2008; TEODORO et al., 2010; LEGRIFON et al., 2012). Os estudos realizados no estado do Paraná mostraram que as espécies *Migonemyia migonei* (França), *Nyssomyia neivai* (Pinto), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Pintomyia fischeri* (Pinto) e *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto) são as mais frequentes, apresentando relevância na epidemiologia da LT (TEODORO et al., 2001b; REINHOLD-CASTRO et al., 2008).

A infecção natural por *Leishmania* já foi assinalada em *Mi. migonei* (AZEVEDO, et al., 1990a; PITA-PEREIRA et al., 2005; CARVALHO et al., 2010c), *Ny. neivai* (CÓRDOBALANÚS et al., 2006; MARCONDES et al., 2009; PITA-PEREIRA et al., 2009; SARAIVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011a), *Ny. whitmani* (AZEVEDO et al., 1990b; GALATI et al., 1996; LUZ et al., 2000; CARVALHO et al., 2008) e *Pi. fischeri* (PITA-PEREIRA et al.,

2011), em várias localidades de diversos estados brasileiros, comprovando o potencial vetorial destas espécies.

As taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* são muito distintas, conforme demonstraram SCODRO et al. (2008) (0%), NEITZKE et al. (2008) (0,04%), JORQUERA et al. (2005) (15,68%), CARVALHO et al. (2008) (0,83% e 7,14%), TIWARY et al. (2012) (4,9% e 17,37%) e KATO et al. (2011) (1,4% e 2,6%). Estudos sobre a taxa de infecção natural em flebotomíneos são importantes pois permitem estimar o risco de infecção por *Leishmania* em áreas endêmicas. Porém, a investigação da infecção natural no estado do Paraná tem sido pouco estudada.

Em estudos de competência vetorial, a dissecação dos insetos pode ser utilizada, embora seja uma técnica demorada e pouco sensível (NEITZKE et al., 2008). A PCR tem sido frequentemente utilizada para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos em áreas onde as taxas de infecção desses insetos são baixas (MICHALSKY et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011a). Estudos sugerem que a PCR pode ser de uso prático para a vigilância epidemiológica da leishmaniose (MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2006), pela sua sensibilidade (detecta a presença de um único parasito), especificidade (independente do número, estágio e localização dos flagelados no trato digestório do vetor) (MEDEIROS et al., 2002; MICHALSKY et al., 2002; PITA-PEREIRA et al., 2005), rapidez e facilidade de execução (MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2006).

RESPOSTA IMUNE

As manifestações clínicas da LT dependem não apenas da espécie de *Leishmania* envolvida, mas também do estado imune do indivíduo infectado. Alguns indivíduos curam precocemente a lesão e outros permanecem meses com a lesão em atividade e o processo de cicatrização mostra-se lento. Este fenômeno pode ser explicado pelo estabelecimento rápido ou tardio de uma resposta imune eficiente na eliminação do parasito.

A resposta imune constitui um mecanismo de defesa local do hospedeiro e se inicia quando células imunes (leucócitos) após redução na velocidade do fluxo sanguíneo, são deslocados para a zona plasmática e apresentam maior contato com o endotélio vascular (etapa de marginação). Posteriormente passam a aderir, momentaneamente, à parede do vaso (etapa de rolamento), e finalmente, dependendo do estímulo, permanecem aderidos ao endotélio (etapa de adesão). Após a adesão, os leucócitos migram em direção ao interstício (etapa de diapedese) (MULLER, 2003; KELLY et al., 2007) para destruir, diluir ou isolar o

agente lesivo (MONTENEGRO, FECCHIO, 1999). A resposta imune mediada por células é essencial para o controle de infecções por patógenos intracelulares.

Após a picada de flebotomíneos naturalmente infectados, que inoculam promastigotas de *Leishmania* na pele, desenvolve-se um processo inflamatório local (TEIXEIRA et al., 2005). O estabelecimento da infecção envolve leucócitos polimorfonucleares e células do sistema mononuclear fagocitário (LAUFS et al., 2002). Os neutrófilos são atraídos para o local nas primeiras horas e contribuem para a defesa inicial contra agentes infecciosos (NATHAN, 2006), agindo através da produção de enzimas proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NATHAN, 2006; ALVES-FILHO et al., 2008) e, mais tarde, controlando o recrutamento de outros tipos celulares (BADOLATO et al., 1996; PETERS et al., 2008). Os macrófagos, oriundos da migração dos monócitos ao sítio de infecção, tornam-se a população dominante na fase tardia da infecção (após 24 horas) e são considerados a mais importante célula reguladora, pois fagocitam, digerem e matam organismos patogênicos através do stress oxidativo (LI et al., 2007; LEÓN, ARDAVÍN, 2008). No entanto, a *Leishmania* apresenta mecanismos de escape, tornando-as capazes de sobreviver transitoriamente dentro dos leucócitos (LASKAY et al., 2008).

O recrutamento celular (número e composição de leucócitos) no estágio inicial depois do estímulo influenciam no desenvolvimento da resposta imune, gerando diferentes formas clínicas da doença ou o controle da infecção (MONTEIRO et al., 2007). É importante lembrar que determinados patógenos possuem fatores de virulência que interferem na migração de leucócitos para o sítio de infecção (CHAVAKIS et al., 2002; BESTEBROER, et al., 2007) e influenciam a composição celular do infiltrado inflamatório e assim, na gravidade da doença (PANARO et al., 1996; MENDES-AGUIAR et al., 2009). Os parasitos podem persistir por anos no hospedeiro (GUEVARA et al., 1993; RAMÍREZ, GUEVARA, 1997) e pode ocorrer disseminação hematogênica e linfática (GUEVARA et al., 1994; CAMERA et al., 2006), principalmente através de leucócitos. Este é o mecanismo mais provável para explicar a ocorrência de formas metastáticas (mucosas e lesões cutâneas recorrentes).

O papel da resposta imune mediada por células tem sido analisado pela relação parasito-hospedeiro, como a susceptibilidade e a resistência a infecções, através da infecção experimental com *Leishmania* em camundongos (SCOTT, FARRELL, 1998; REIS et al., 2006). Tem-se grande interesse dos pesquisadores em entender os mecanismos da susceptibilidade e da resistência a leishmaniose. Assim, é importante o conhecimento do recrutamento celular para o sítio de inoculação dos parasitos a fim de entender as diferentes formas clínicas.

JUSTIFICATIVA

Os aspectos comportamentais dos flebotomíneos e o impacto das mudanças ambientais na população destes insetos ainda são pouco estudados, considerando a ampla distribuição geográfica das leishmanioses. Por este motivo, o estudo da frequência de flebotomíneos no domicílio e peridomicílio em áreas endêmicas de LT devem ser aprofundadas a fim de melhor entender a biologia dos flebotomíneos e assim, os mecanismos de transmissão das leishmanioses.

Estudos sobre a competência vetorial e as taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* ainda é pouco estudada em localidades do estado do Paraná. O conhecimento da taxa de infecção e a correta identificação do agente etiológico são importantes na epidemiologia das leishmanioses. Assim, estudos para se conhecer a taxa de infecção de vetores naturalmente infectados devem ser estimuladas pois auxiliam no entendimento do real risco de transmissão de LT em áreas endêmicas.

A presença, em áreas endêmicas, de diferentes espécies de *Leishmania* com características clínicas semelhantes requer o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais precisos e sensíveis, que possibilitem a detecção das espécies de *Leishmania* a fim de avaliar o prognóstico da LT e para a escolha da terapia apropriada. Pacientes suspeitos de LT devem ser rápido e corretamente diagnosticados, pois se não tratados, podem evoluir para a forma mucosa, potencialmente grave. A associação entre diferentes metodologias para melhorar o diagnóstico de LT têm sido sugerida e a escolha dos métodos a serem utilizados também depende de diversos fatores. Assim, há necessidade de desenvolvimento de métodos mais sensíveis e que podem ser utilizados para controle de cura e acompanhamento dos pacientes.

O surgimento de diferentes manifestações clínicas de LT e a presença, em áreas endêmicas, de diversas espécies de *Leishmania*, requer o estudo de casos com diferentes características clínicas que possibilitem à atenção para o desenvolvimento de casos atípicos da LT.

OBJETIVOS

GERAL

Analisar mudanças ambientais para o controle de flebotomíneos e estudar técnicas moleculares para detecção de *Leishmania* spp.

ESPECÍFICOS

Conhecer a diversidade da fauna de flebotomíneos, o comportamento destes insetos em diversos ecótopos e os efeitos de modificações no peridomicílio sobre a densidade desses insetos no domicílio.

Investigar a taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania (Viannia)*, utilizando a multiplex-PCR para verificar a competência vetorial desses dípteros e a detecção do agente.

Estimar a acurácia da PCR em amostras biológicas obtidas por escarificação de lesão e de leucócitos do sangue periférico, comparando-as com técnicas convencionais para o diagnóstico de LT.

Relatar um caso de LT (forma cutânea) autóctone do estado do Paraná, com lesões atípicas, chamando a atenção para a gravidade da doença e as diversas manifestações clínicas.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-FILHO, G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 19-28, 1989.

ALVES-FILHO, J.C.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30, p. 1-7, 2008.

AVILES, H.; BELL, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasite in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 181-187, 1999.

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, 1990a.

AZEVEDO, A.C.; 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, 1990b.

BADOLATO, R.; SACKS, D.L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Experimental Parasitology**, v. 82, p. 21-26, 1996.

BÃNULS, A.L.; BASTIEN, P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1451-1461, 2011.

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p.102-109, 1998.

BESTEBROER, J.; POPPELIER, M.J.; ULFMAN, L.H.; LENTING, P.J.; DENIS, C.V.; VAN KESSEL, K.P.; VAN STRIJP, J.A.; HAAS, C.J. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. **Blood**, v. 109, p. 2936-2943, 2007.

BRACHO, C.O.; QUINTANA, L.P.; ARENAS, S.M.; PARRA, M.R. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 549-554, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana 2007. Disponível em <http://goo.gl/mPcbz> (Acessado em 05/03/2013).

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas - 1990 a 2011. 2012a. Disponível em: <http://goo.gl/VzdJR> (Acessado em 05/03/2013).

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas - 1990 a 2011. 2012b. Disponível em: <http://goo.gl/ijNPY> (Acessado em 05/03/2013).

CÂMERA, P.O.; JUNGGERA, J.; PIRESA, F.E.S.S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in human american tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 1112-1117, 2006.

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 Diseases**, v. 8, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, M.S.L.; BREDT, A.; MENECHIN, E.R.S.; OLIVEIRA, C. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, p. 227-237, 2010a.

CARVALHO, S.M.S.; SANTOS, P.R.B.; LANZA, H.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Diversity of phlebotomine sand flies in Ilheus, state of Bahia, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, p. 239-244, 2010b.

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

CHAVAKIS, T.; HUSSAIN, M.; KANSE, S.M.; PETERS, G.; BRETZEL, R.G.; FLOCK, J.I.; HERMANN, M.; PRISSNER, K.T. Staphylococcus aureus extracellular adherence

protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine*, v. 8, p. 687-693, 2002.

CÓRDOBA-LANÚS, E.; GROSSO, M.L.; PIÑERO, J.E.; VALLADARES, B.; SALOMÓN, O.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Tropica*, v. 98, p. 1-5, 2006.

COSTA, S.M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J.C.; LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 149-153, 2007.

CURTI, M.C.M.; SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; ZANZARINI, P.D.; VENAZZI, E.A.S.; FERNANDES, A.C.S.; TEIXEIRA, J.J.V.; LONARDONI, M.V.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região noroeste do estado do Paraná. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 63-68, 2009.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DIETZE, R. Leishmaniose tegumentar americana. In: Cimerman S; Cimerman B. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu; p. 85-103, 2003.

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C.C.; BOGIO, A.; ANTONIO, L.F.; SCHIAVONI, P.B.; MONTEIRO, V.S.; MADEIRA, M.F.; QUINTELLA, L.P.; VALETE-ROSALINO, C.M.; VASCONCELLOS, E.C.F.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 109-112, 2010.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose tegumentar americana. In: Veronesi R; Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. 3ª edição. São Paulo: Atheneu; p. 1543-1557, 2005.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M.A.; ROCHA, H.C.; GARCIA, W.B. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, p. 115-128, 1996.

GOMES, A.C.; NEVES, V.L.F.C. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 553-558, 1998.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GUEVARA, P.; RAMÍREZ, J.L.; ROJAS, E.; SCORZA, J.V.; GONZÁLEZ, N.; AÑEZ, S. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **The Lancet**, v. 341, p. 1341, 1993.

GUEVARA, P.; ROJAS, E.; GONZALEZ, N.; SCORZA, J.V.; AÑEZ, N.; VALERA, M.; RAMÍREZ, J.L. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 1, p. 385-389, 1994.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.

ISAZA, D.M.; ARBOLEDA, M.; RESTREPO, M.; MCCANN, S.H.E.; BARKER, D.C. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 165-168, 2002.

JORQUERA, A.; GONZÁLEZ, R.; MARCHÁN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 45-48, 2005.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁRCERES, A.G.; VARGAS, F.; MIMORI, T.; YAMAMOTO, K.; IWATA, H.; KORENAGA, M.; VELEZ, L.; HASHIGUCHI, H. Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 515-521, 2011.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 3-10, 2007.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, p. 183-191, 2008.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 826-835, 2002.

LEÓN, B.; ARDAVÍN, C. Monocyte migration to inflamed skin and lymphonodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. **Blood**, v. 111, p. 3126-3130, 2008.

LEGRIFON, C.M.O.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; FENELON, V.C.; NEITZKE-ABREU, H.C.; TEODORO, U. Sandfly frequency in a clean and well-organized rural environment in the state of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 77-82, 2012.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNE, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LIMA, A.P.; MINELLI, L.; TEODORO, U.; COMUNELLO, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 681-692, 2002.

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

MARCONDES, C.B.; CONCEIÇÃO, B.E.M.; PORTES, M.G.T.; SIMÃO, B.P. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian state of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 353-355, 2005.

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.

MARCUSSI, V.M.; MARCUSSI, L.M.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 300-305, 2008.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (Espundia Escamel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARTIN-SÁNCHEZ, J.; GÁLLEGO, M.; BARÓN, S.; CASTILLEJO, S.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 527-532, 2006.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1145-1149, 1995.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S.; ROSELINO, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Research**, v. 35, p. 421-424, 2002.

MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; MEMBRIVE, U.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. **Entomología y Vectores**, v. 11, p. 673-680, 2004.

MENDES-AGUIAR, C.O.; GOMES-SILVA, A.; NUNES JR, E.; PEREIRA-CARVALHO, R.; NOGUEIRA, R.S.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; BERTHO, A.L., DA CRUZ, A.M. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by

Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 377-384, 2009.

MICHALSKY, É.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; DIAS, E.S. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotômíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, p. 150-158, 2006.

MONTEIRO, M.C.; LIMA, H.C.; SOUZA, A.A.A.; TITUS, R.G.; ROMÃO, P.R.T.; CUNHA, F.Q. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 88-94, 2007.

MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; FERREIRA, M.E.M.C.; TEODORO, U. Geographic distribution and epidemiological features of American tegumentary leishmaniasis in old rural settlements in Paraná state, southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 1291-1303, 2008.

MONTENEGRO, M.R.; FECCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: Montenegro MR; Franco M. Patologia: processos gerais. 4º edição. São Paulo: Atheneu; p. 109-128, 1999.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 327-334, 2003.

MUNIZ, L.H.G.; ROSSI, R.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; TEODORO, U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotômíneos em área rural no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 1087-1093, 2006.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; DIAS, A.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotômíneos por *Leishmania*, no estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 17-22, 2008.

NEITZKE-ABREU, H.C.; SANTOS, D.R.; SILVA, A.M. REINHOLD-CASTRO, K.R.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U. Alteration in frequency of sand flies in domiciles after changes in the peridomicile area, State of Paraná, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, p. 466-470, 2012.

OLIVEIRA, J.G.S.; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, C.J.; JUNIOR, A.C.; CAMPOS, L.F.; ROCHA, A.V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; COSTA, J.M.L.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 94, p. 55-59, 2005.

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, 2011a.

OLIVEIRA, D.M.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal Infections Diseases**, v. 15, p. 204-210, 2011b.

PALHETA-NETO, F.X.; RODRIGUES, A.C.; SILVA, L.L.; PALHETA, A.C.P.; RODRIGUES, L.G.; SILVA, F.A. Manifestações otorrinolaringológicas relacionadas à leishmaniose tegumentar americana: revisão de literatura. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 12, p. 531-537, 2008.

PANARO, M.A.; PUCCINI, V.; FALIERO, S.M.; MARZIO, R.; MARANGI, A.; LISI, S.; BRANDONISIO, O. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (LPG) inhibits respiratory burst and chemotaxis of dog phagocytes. **New Microbiology**, v. 19, p. 107-112, 1996.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, p. 970-973, 2008.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.R.; SOUZA, M.B.; BRAZIL, R.P.; BERTHO, A.L.; FIGUEIREDO-BARBOSA, A.; 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 and 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.

RAMÍREZ, J.L.; GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 333-338, 1997.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 207-255, 2003.

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.

REIS, L.C.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 103-115, 2006.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B.E.; BARKER, D.C.; DAVIES, C.R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, p. 748-751, 2000.

RIDLEY, D.S.; MAGALHÃES, A.V.; MARSDEN, P.D. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Pathology**, v. 159, p. 293-299, 1989.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N.G.; KIBBI, A.G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 291-296, 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.

SCODRO, R.B.L.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; DIAS-SVERSUTTI, A.C.; NEITZKE-ABREU, H.C.; MEMBRIVE, N.A.; KÜHL, J.B.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Investigation of natural infection by *Leishmania* in sandflies of Paraná state, southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 483-491, 2008.

SCOTT, P.; FARREL, J.P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T Cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chemical Immunology**, v. 70, p. 60-80, 1998.

SILVA, A.M.; CAMARGO, N.J.; SANTOS, D.R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A.C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E.C.; KONOLSAISEN, J.F.; BISELTO JR, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E.A.B. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 37, p. 209-225, 2008.

SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; ROBERTO, A.C.B.S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A.N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observations on laboratory diagnosis and cutaneous leishmaniasis epidemiology in the State of Paraná State, South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 413-423, 1999.

SINGH, S.; DEY, A.; SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, p. 251-265, 2005.

TEIXEIRA, C.R.; TEIXEIRA, M.J.; GOMES, R.B.B.; SANTOS, C.S.; ANDRADE, B.B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J.S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J.C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 8346-8353, 2005.

TEODORO, U.; KÜHL, J.B.; ABBAS, M.; DIAS, A.C. Luz e aves como atrativos de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae), no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 45, p. 167-172, 2001a.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V.; SANTOS, D.R.; SANTOS, E.S.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J.B. Frequência da fauna de flebotômíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo – Estado do Paraná – Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 209-233, 2001b.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V.; SANTOS, D.R.; SANTOS, E.S.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J.B.; ALBERTON, D. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotômíneos, no município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 1801-1813, 2003.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; SANTOS, E.S.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; ROSSI, R.M.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Avaliação de medidas de controle de flebotômíneos no município de Lobato, estado do Paraná, sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 451-455, 2006a.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Informações preliminares sobre flebotômíneos no norte do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 327-330, 2006b.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; KÜHL, J.B.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C. Avaliação de medidas de controle de flebotômíneos no norte do estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2597-2604, 2007.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SILVA, A.M.; MASSAFERA, R.; IMAZU, L.E.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE-ABREU, H.C. Fauna de flebotômíneos em municípios do norte pioneiro do estado do Paraná, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, p. 322-330, 2010.

TIWARY, P.; KUMAR, D.; SINGH, R.P.; RAI, M.; SUNDAR, S. Prevalence of sand flies and *Leishmania donovani* infection in a natural population of female *Phlebotomus argentipes* in Bihar State, India. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, p. 467-472, 2012.

VENAZZI, E.A.S.; ROBERTO, A.C.B.S.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; ZANZARINI, P.D.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 427-430, 2006.

VENAZZI, E.A.S.; ROBERTO, A.C.B.S.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; ZANZARINI, P.D.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in blood from patients with american cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 399-402, 2007.

VEXENAT, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 177-185, 1996.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis 2010. Disponível em <http://goo.gl/1WxXs> (Acessado em 05/03/2013).

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis 2013. Disponível em <http://goo.gl/PiM9n> (Acessado em 05/03/2013).

CAPÍTULO II

**Artigo 1: “ALTERATION IN FREQUENCY OF SAND FLIES IN DOMICILES
AFTER CHANGES IN THE PERIDOMICILE AREA, STATE OF PARANÁ,
BRAZIL”**

ALTERATION IN FREQUENCY OF SAND FLIES IN DOMICILES AFTER CHANGES IN THE PERIDOMICILE AREA, STATE OF PARANÁ, BRAZIL

Herintha C. Neitzke-Abreu¹, Demilson R. Santos², Allan M. Silva³, Kárin R. Reinhold-Castro¹, Thaís G. V. Silveira¹, Maria V. C. Lonardoní¹, and Ueslei Teodoro¹

¹Health Sciences Postgraduate Program, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, State of Paraná, Brazil, Avenue Colombo, 5790, 87020-900, uteodoro@uem.br

²Nucleus of Entomology, 15th Regional Health Unit of Paraná, Maringá, Brazil

³Environmental Health Center, Health Secretary of Paraná State, Brazil

Studies on sand flies are important because of their ability to transmit pathogens that cause leishmaniasis, bartonellosis, and arboviruses in the New World (Silva et al. 2007). The leishmaniasis are among the neglected diseases that have undergone resurgence since the 1970s, and their incidence has increased year after year in 88 countries, where 350 million people live in risk areas. In Brazil, cutaneous leishmaniasis (CL) has been reported in all states.

The presence of sand flies and wild mammals (reservoirs of *Leishmania* species) in peridomicile areas of rural and urban environments has sustained the *Leishmania* transmission cycle in areas that are highly impacted as a result of the replacement of native forests by plantations and pastures (Lima et al. 2002, Muniz et al. 2006). Domestic animal shelters constructed near human habitations, as well as poor hygiene conditions in the peridomicile area, which is often located next to small patches of woodlands, allow the circulation of wild mammals and sand flies, since the sand flies easily find blood meals in the peridomicile area (Lima et al. 2002, Teodoro et al. 2001a, Teodoro et al. 2001b).

Studies of the behavior of the fauna and sand flies, as well as their interactions with the environment in the units that compose the *Leishmania* transmission network, extend our knowledge about the aspects of the endemic and allow health agencies to direct control actions more efficiently and effectively in areas with a transmission risk. Reorganization and cleaning of peridomiciles, and also the use of insecticides in rural buildings, have decreased

sand fly populations in domiciles in CL-endemic areas (Teodoro et al. 2003a, Teodoro et al. 2006a, Teodoro et al. 2007a).

Although CL has been intensively studied, some behavioral aspects of its insect vectors remain incompletely understood. In view of records of autochthonous CL cases in the municipality of Mandaguari, State of Paraná, the aim of this study was to show the importance of understanding the diversity of the sand fly fauna, its behavior in different ecotopes, and the effects of changes in domestic-animal shelters on the density of these insects in the domiciles, in order to more effectively prevent CL transmission.

The Flor de Maio Grange is located in the municipality of Mandaguari (23° 31'S and 51° 41'W) in north-central Parana. The climate is subtropical humid mesothermal, with warm wet summers and a mean temperature above 22° C; in winter, frosts are infrequent, the dry season is mild, and the mean temperature is below 18° C. The original semideciduous seasonal forest vegetation in this region was almost totally devastated by conversion of the municipality land to cultivation of soybeans, coffee, corn, wheat, sugar cane and other crops, and pasturage. The vegetation at Flor de Maio Grange consisted mainly of the fruit trees jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) and mango (*Mangifera indica*), near a small area of significantly impacted scrub vegetation. Four residences were located near each other, and dogs and chickens roamed freely on the ground around the residences and wooded areas (Figure 1). The cattle and horses occupied a small pasture, and several pigs were confined in a pen, also near the residences. These animal shelters contained an accumulation of organic matter (leaves and fallen fruit), agricultural wastes, pet feces, uneaten feed, and muddy soil where the residents disposed of water, shaded by trees that prevented the soil from drying. In the rear of the grange were two small streams with sparse riparian vegetation and a water flow only during periods of heavy rainfall (Muniz et al. 2006).

Sand flies were collected with Falcão traps, biweekly in two stages. The first stage (FS) was from February to September 2006, from 18:00 to 06:00, totaling 192 h per trap; the second stage (SS) extended from December, 2006 to August, 2007, from 20:00 to 06:00, totaling 180 h per trap. The traps were placed in ecotopes (E) in the woods (E1 and E4), residences (E2 and E6), and peridomicile [animal shelters: a pig sty (E3) and a cattle shelter (E5)] (Figure 1). The sand flies collected were identified in the laboratory of the Entomology Center of the 15th Regional Health Unit of Paraná and the Basic Parasitology Laboratory of the Universidade Estadual de Maringá (UEM). The nomenclature for sand fly species follows Galati (2003), and abbreviations are according to Marcondes (2007).

In the interval between the two sampling stages, several changes were made to the environment, including cutting some trees and bushes to reduce the amount of shade, dry the soil, and reduce the accumulation of fallen leaves, and removal of organic matter (domestic-animal feces and agricultural waste), especially around the animal shelters, to reduce the frequency of sand flies inside the residences (Teodoro et al. 2006b). The peridomicile was cleaned in order to decrease the possibility of formation of sand fly breeding sites in wet soils with decaying organic matter. The temperature was measured at the beginning and end of each sand fly collection. The rainfall data were provided by the Climatological Station of the UEM.

Statistical analysis was based on the hourly mean (HM) number of sand flies collected, given the number of sand flies collected divided by the number of hours collected, in two collections per month that totaled 192 h in FS and 180 h in SS. The HM was analyzed by the Mann-Whitney test with the program Statistica 7.1, considering $p \leq 0.05$ to be significant. The proportions were analyzed with a confidence interval of 95% (95% CI), by the Mid-p exact test with the program OpenEpi version 2.3.

In the entire study period, 12 species of sand flies were collected (Table 1), of which *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri*, *Pintomyia pessoai*, and *Psathyromyia shannoni* were found previously in Flor de Maio Grange (Muniz et al. 2006, Teodoro et al. 2006b). The species found in this locality have been reported from several other municipalities in Parana, in areas with similar environmental characteristics (Membrive et al. 2004, Teodoro et al. 2003b, Teodoro et al. 2006a, Teodoro et al. 2006b, Teodoro et al. 2007a, Teodoro et al. 2010).

In the FS, 3,268 (HM 17.02) sand flies were collected, and in the SS 20,872 (HM 115.96); the increase in numbers from the first to second stages was significant ($p=0.0051$). In the FS, 2,108 (HM 10.98) males and 1,160 (HM 6.04) females, and in the SS, 9,392 (HM 52.18) males and 11,480 (HM 63.78) females were collected. The proportion of females in the SS (55.00; 95% CI, 54.33-55.68) was higher than in the FS (35.50; 95% CI, 33.87-37.15).

Ny. whitmani predominated in both the FS (91.25%; 95% CI, 90.24-92.18) and the SS (95.45%; 95% CI, 95.16-95.73). The predominance of this species was observed previously in the same locality (Muniz et al. 2006, Teodoro et al. 2006b) and in other municipalities of north-central Parana (Luz et al. 2000, Membrive et al. 2004, Teodoro et al. 2006a, Teodoro et al. 2006b, Teodoro et al. 2007b). The number of *Ny. whitmani* females was higher in the SS (55.08; 95% CI, 54.39-55.77) than in the FS (35.45; 95% CI, 33.74-37.18). Luz et al. (2000) detected a natural infection of *Ny. whitmani* by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Parana,

showing the importance of this species in CL epidemiology in this state. *Pi. fischeri* was the second most frequent species in both sampling periods, with HM 0.95 in FS and 2.83 in SS.

The mean temperature in FS was 18.2° C, with a minimum of 15.7° C in July and a maximum of 23.0° C in March. The mean temperature in SS was 19.6° C, with a minimum of 11.3° C in May and a maximum of 24.5° C in March. The rainfall in FS was 995.5 mm; the rainfall was lowest in May (11.7 mm) and highest in February (283.2 mm). The rainfall in SS was 1,277.2 mm with a minimum in June (7.8 mm) and a maximum in December (283.3 mm) (Figure 2).

In FS, sand flies were collected mainly in March, June, and August (2,800 specimens; HM 38.89). In March, the HM was 72.68 (1,744 specimens), especially in E2 and E6 (1,408 specimens; HM 29.34). In June, the HM was 27.25 (654 specimens), especially in E3 and E4 (497 specimens; HM 10.35). In August, the HM was 16.76 (402 specimens), especially in E2 and E3 (288 specimens; HM 6.00). In SS, sand flies were collected mainly in January, March, and April (19,044 specimens; HM 317.40). In January, HM was 277.15 (5,543 specimens), especially in E3, E5 and E6 (4,883 specimens; HM 81.38). In March, HM was 463.85 (9,277 specimens), especially in E3 (8,364 specimens; HM 418.20). In April, HM was 211.20 (4,224 specimens) especially in E3 (3,130 specimens; HM 156.50) (Table 2).

In FS, 3,268 (HM 17.02) sand flies were collected: 1,777 (HM 9.26) specimens in the residences (E2 and E6); 934 (HM 4.86) in the pig sty (E3) and cattle shelter (E5); and 557 (HM 2.91) in the woods (E1 and E4). In SS, 20,872 (HM 115.96) specimens were collected: 4,098 (HM 22.77) specimens in the residences (E2 and E6); 15,724 (HM 87.36) in the pig sty (E3) and the cattle shelter (E5); and 1,050 (HM 5.83) in the woods (E1 and E4) (Table 2). Significantly fewer sand flies were collected in FS than in SS, probably a result of the decrease in rainfall from April to August, 2006. Rainfall had greater influence on the sand fly populations than temperature and relative humidity, which did not fluctuate as widely during the year. A similar strong influence of rainfall has been observed in previous studies on sand fly behavior (Massafera et al. 2005, Reinhold-Castro et al. 2008, Teodoro et al. 2003b, Teodoro et al. 2004, Teodoro et al. 2006b, Teodoro et al. 2007a). The HM of sand flies collected in the peridomicile area (pig sty and cattle shelter) was significantly higher in SS ($p=0.0184$); however, the sand fly HM in FS did not differ from the HM in SS in the residences ($p=0.1643$) and the woods ($p=0.1441$). In SS, 75.34% of the sand flies were collected in the pigsty (E3) and the cattle shelter (E5), and in these ecotopes the HM was approximately 18 times higher in SS. Sand flies are often collected in domestic-animal shelters, since these animals are highly attractive blood sources for female sand flies

(Reinhold-Castro et al. 2008, Teodoro et al. 2007a, Teodoro et al. 2007b). In these shelters, sand flies found a suitable site for copulation, with available organic matter and damp soil in the surroundings, appropriate conditions for breeding sites (Teodoro et al. 2003a, Teodoro et al. 2006a, Teodoro et al. 2007a, Teodoro et al. 2010).

The results show that the HM of sand flies collected in SS was 6.8 times higher than in FS, probably because of the prolonged dry period in FS. However, it is noteworthy that the total sand fly HM collected in both residences in the FS did not differ from the sand fly HM collected in the SS. However, the number of sand flies found in residence E6 was 4.8 times higher in SS than in FS. This residence is surrounded by many fruit trees, especially mangoes, with constantly damp soil and abundant organic matter from fallen leaves, twigs, and fruits decomposing on the ground, forming appropriate sand fly breeding sites. These data show that the measures employed were insufficient to prevent sand flies from invading residence E6. In the peridomicile (E3 and E5), the number of sand flies collected in SS increased significantly compared to FS. If those changes (cutting some trees and bushes and removing organic matter) had not been made, the number of sand flies in SS probably would have been higher, with a predominance in residences rather than in peridomestic habitats, increasing the risk of transmission of CL.

In this study, 12 sand fly species were collected, especially in domestic-animal shelters and in months with higher rainfall. In SS, the number of sand flies was significantly higher than in the FS. These observations emphasize the importance of keeping the peridomestic environment clean, to prevent the accumulation of organic matter (fallen leaves, twigs, and fruits decomposing on the ground, domestic animal feces and agricultural waste) and soil moisture, as well as the formation of sand fly breeding sites.

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for financial support, and Ademar R. Santos, Luiz P. Poiani and Otilio Oliveira, endemic guards of the Nucleo de Entomologia de Maringa, and Joao B. Kuhl, technician of the Department of Basic Health Sciences of UEM, for instruction and aid in the identification of sand flies.

REFERENCES CITED

- Galati, E.A.B. 2003. Morfologia e Taxonomia. In: E.F. Rangel, and R. Lainson (eds.) pp. 23-51. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz.

- Lima, A.P., L. Minelli, U. Teodoro, and E. Comunello. 2002. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 77: 681-692.
- Luz, E., N. Membrive, E.A. Castro, J. Dereure, F. Pratlong, 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.
- Marcondes, C.B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol. News.* 118: 351-356.
- Massafera, R., A.M. Silva, A.P. Carvalho, D.R. 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.
- Membrive, N.A., G. Rodrigues, U. Membrive, W.M. Monteiro, H.C. Neitzke, M.V.C. Lonardoni, T.G.V. Silveira, and U. Teodoro. 2004. Flebotomíneos de municípios do norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Entomol. Vect.* 11: 673-680.
- Muniz, L.H.G., R.M. Rossi, H.C. Neitzke, W.M. Monteiro, and U. Teodoro. 2006. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 40: 1087-93.
- Reinhold-Castro, K.R., R.B.L. Scodro, A.C. Dias-Sversutti, H.C. Neitzke, R.M. Rossi, J.B. Kühl, T.G.V. Silveira, and U. Teodoro. 2008. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41: 269-276.
- Silva, D.F., R.A. Freitas, and A.M.R. Franco. 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. Neotrop. *Entomol.* 36: 138-144.
- Teodoro, U., J.B. Kühl, M. Abbas, and A.C. Dias. 2001a. Luz e aves como atrativos de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), no sul do Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 45: 167-172.
- Teodoro, U., T.G.V. Silveira, D.R. Santos, E.S. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, and J.B. Kühl. 2001b. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo – Estado do Paraná – Brasil. *Rev. Patol. Trop.* 30: 209-233.
- Teodoro, U., T.G.V. Silveira, D.R. Santos, E.S. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, J.B. Kühl, and D. Alberton. 2003a. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da

- desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos, no município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 19: 1801-1813.
- Teodoro, U., D. Alberton, J.B. Kühl, E.S. Santos, D.R. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, T.G.V. Silveira, and M.V.C. Lonardoni. 2003b. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodiade) em área urbana no sul do Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 37: 651-656.
- Teodoro, U., V. Thomaz-Soccol, J.B. Kühl, D.R. Santos, E.S. Santos, A.R. Santos, M. Abbas, and A.C. Dias. 2004. Reorganization and Cleaness of Peridomiciliar Area to Control Sandflies (Diptera, Pschodidae, Phlebotominae) in South Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 47: 205-212.
- Teodoro, U., D.R. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, E.S. Santos, H.C. Neitzke, W.M. Monteiro, R.M. Rossi, M.V.C. Lonardoni, and T.G.V. Silveira. 2006a. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no Município de Lobato, Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 22: 451-455.
- 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. Lonardoni, and T.G.V. Silveira. 2006b. Informações preliminares sobre flebotomíneos no Norte do Paraná. *Rev. Saúde Pública*. 40: 327-330.
- Teodoro, U., D.R. Santos, A.R. Santos, O. Oliveira, L.P. Poiani, J.B. Kühl, M.V.C. Lonardoni, T.G.V. Silveira, W.M. Monteiro, and H.C. Neitzke. 2007a. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 23: 2597-2604.
- Teodoro, U., M.V.C. Lonardoni, T.G.V. Silveira, A.C. Dias, M. Abbas, D. Alberton, and D.R. Santos. 2007b. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 41: 383-388.
- Teodoro, U., D.R. Santos, A.M. Silva, R. Massafra, L.E. Imazu, W.M. Monteiro, and H.C. Neitzke-Abreu. 2010. Fauna de febotomíneos em municípios do Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Patol. Trop*. 39: 322-330.

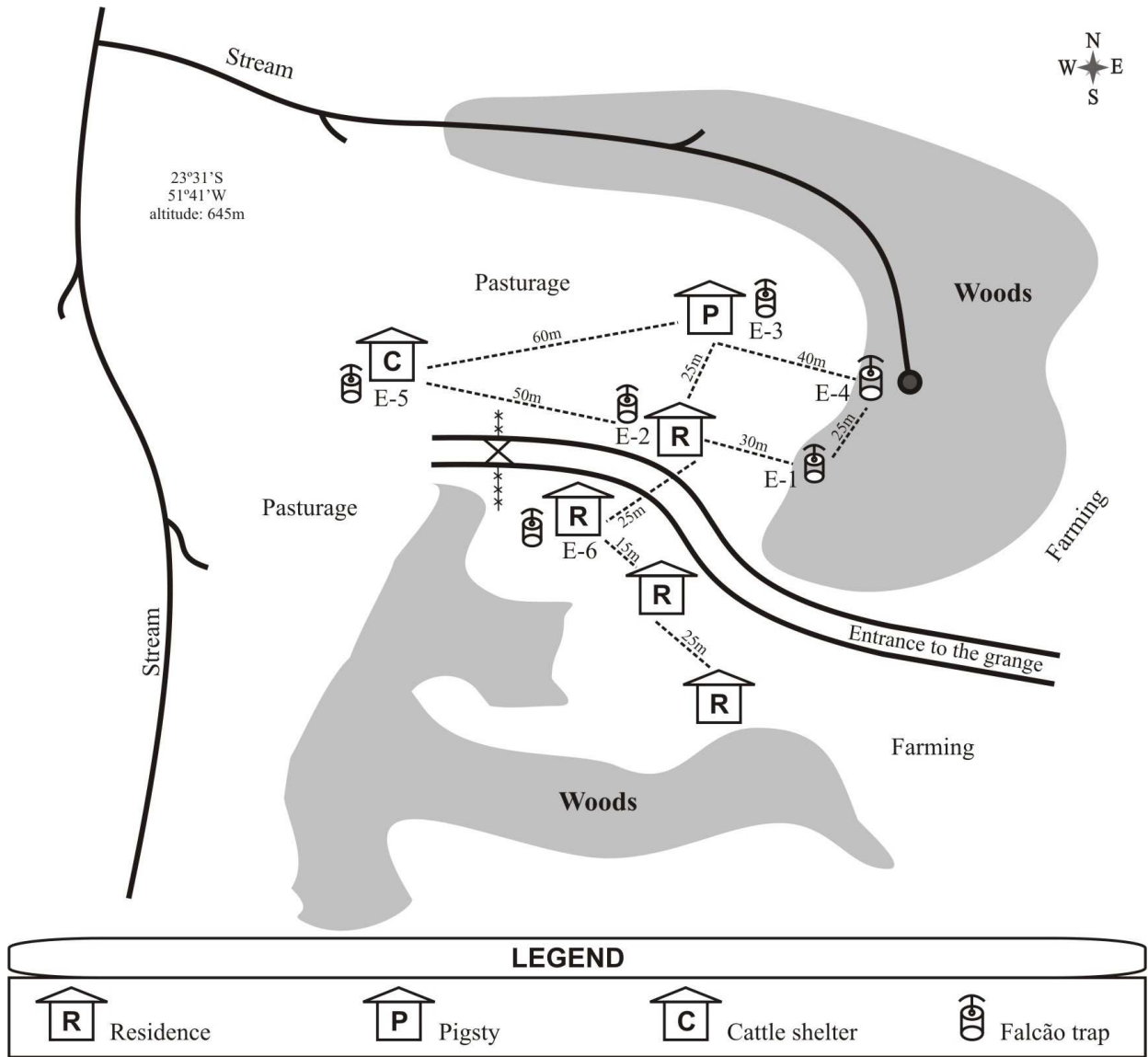


Figure 1. Distribution of Falcão traps in the different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil.

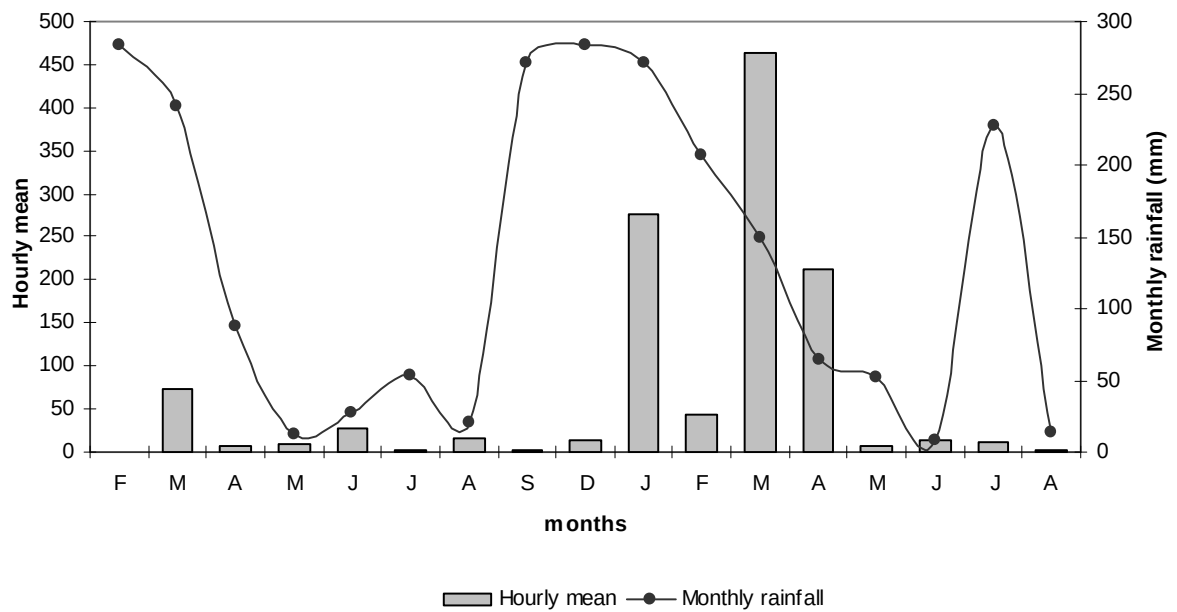


Figure 2. Monthly rainfall and sand fly hourly mean numbers collected in all the traps in the different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007.

Table 1. Sand flies collected in different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007.

Period	February to September				December to August			
Species	Males	Females	Total	HM	Males	Females	Total	HM
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1,925	1,057	2,982	15.53	8,950	10,973	19,923	110.68
<i>Pintomyia fischeri</i>	115	67	182	0.95	224	286	510	2.83
<i>Migonemyia migonei</i>	47	24	71	0.37	161	171	332	1.84
<i>Nyssomyia neivai</i>	16	5	21	0.11	43	20	63	0.35
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2	4	6	0.03	11	24	35	0.19
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	1	1	2	0.01	-	-	-	-
<i>Pintomyia misionensis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-
<i>Psathyromyia shannoni</i>	-	1	1	-	2	2	4	0.02
<i>Psathyromyia lanei</i>	1	-	1	-	-	-	-	-
<i>Expapilatta firmatoi</i>	1	-	1	-	1	1	2	0.01
<i>Pintomyia pessoai</i>	-	-	-	-	-	1	1	-
<i>Pintomyia monticola</i>	-	-	-	-	-	2	2	0.01
Total	2,108	1,160	3,268	17.02	9,392	11,480	20,872	115.96
Hourly mean	10.98	6.04	17.02	-	52.18	63.78	115.96	-

Table 2. Hourly mean number of sand flies collected in different ecotopes in the Flor de Maio Grange, municipality of Mandaguari, State of Paraná, Brazil, from February to September, 2006 and from December, 2006 to August, 2007.

Month/Ecotope	E1	E2	E3	E4	E5	E6	Total
February	0	0	0	0.38	0	0	0.38
March	5.46	33.71	0	2.38	6.17	24.96	72.68
April	0.92	1.33	2.42	0.13	0	2.13	6.93
May	0.29	0.33	1.42	0.21	5.75	0.88	8.88
June	1.04	3.13	11.08	9.63	1.58	0.79	27.25
July	0.21	0.13	0.08	0.71	0.13	0.25	1.51
August	0.42	4.96	7.04	1.33	2.38	0.63	16.76
September	0.13	0.54	0	0	0.88	0.29	1.84
Mean	1.06	5.52	2.75	1.85	2.11	3.74	17.02
December	1.15	5.95	2.30	0.55	2.15	2.10	14.20
January	0.60	0.90	61.75	31.50	74.25	108.15	277.15
February	1.70	3.70	8.20	0.45	20.15	9.15	43.35
March	2.80	1.95	418.20	0.65	5.90	34.35	463.85
April	2.00	21.55	156.50	3.70	21.20	6.25	211.20
May	0.40	6.50	0	0.95	0.05	0.05	7.95
June	0.60	2.05	0.20	1.80	9.05	0.45	14.15
July	3.10	0.50	2.55	0.30	3.00	1.05	10.50
August	0.25	0.20	0.50	0	0.25	0.05	1.25
Mean	1.40	4.81	72.24	4.43	15.11	17.96	115.96

E1, E4=woods; E2, E6=residences; E3=pig sty; E5= cattle shelter.

Artigo 2: “DETECTION OF *LEISHMANIA (VIANNIA)* IN *NYSSOMYIA NEIVAI* AND *NYSSOMYIA WHITMANI* BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION, IN SOUTHERN BRAZIL”

Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in southern Brazil

Herintha Coeto Neitzke-Abreu^a, Kárin Rosi Reinhold-Castro^a, Mateus Sabaini Venazzi^b, Regiane Bertin de Lima Scodro^c, Alessandra de Cassia Dias^a, Thaís Gomes Verzignassi Silveira^{a,c}, Ueslei Teodoro^a and Maria Valdrinez Campana Lonardoni^{a,c,*}

^aHealth Sciences Postgraduate Program, Universidade Estadual de Maringá, Avenue Colombo, 5790, Maringá, Paraná State, 87020-900, Brazil. E-mail: herintha@yahoo.com.br; karindecastro@yahoo.com.br; [alecassiadiaz_8@hotmail.com](mailto:alecassiadiaz8@hotmail.com); uteodoro@uem.br.

^bDepartment of Medicine, Universidade Estadual de Maringá, Avenue Colombo, 5790, Maringá, Paraná State, 87020-900, Brazil. E-mail: mateus_ve@hotmail.com.

^cDepartment of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Avenue Colombo, 5790, Maringá, Paraná State, 87020-900, Brazil. E-mail: regianebertin@yahoo.com.br; tgvsilveira@gmail.com.

*Corresponding author. Tel.: 55 44 3011 4878, fax: 55 44 3011 4860.
E-mail address: mvclonardoni@gmail.com (M.V.C. Lonardoni)

Abbreviations

CL: cutaneous leishmaniasis

Multiplex PCR: Multiplex Polymerase Chain Reaction

Abstract

Sandflies transmit pathogens of leishmaniasis and infection rate and the identification of *Leishmania* species of these insects provide information about the likelihood of human infection in endemic areas. The natural infection of sandflies by *Leishmania* (*Viannia*) were assessed in municipalities of Paraná State, southern Brazil. Sandflies were collected with Falcão and Shannon traps. After dissection for searching flagellates in digestive tubes and identification of the species, female sandflies were submitted to Multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR) for detection of the 70-bp fragment of the kDNA of *Leishmania* (*Viannia*) and the 220-bp fragment from the *IVS6* cacophony gene region of the insects of the genus *Lutzomyia*. The analysis was performed in pools containing 7 to 12 guts from females of the same species. A total of 510 female sandflies were analyzed, including 9 *Migonemyia migonei*, 17 *Pintomyia fischeri*, 216 *Nyssomyia neivai*, and 268 *Nyssomyia whitmani*. Although none female was found naturally infected by flagellates through out dissection, the fragment of DNA from *Leishmania* (*Viannia*) was shown by multiplex PCR in one sample of *Ny. neivai* (0.46%) and three samples of *Ny. whitmani* (1.12%). It was concluded that *Ny. neivai* and *Ny. whitmani* are susceptible to *Leishmania* infection, and that multiplex PCR, because of its sensitivity, specificity and feasibility, can be used in epidemiological studies to detection of the natural infection of the sandfly vector.

Keywords

Cutaneous leishmaniasis; sandfly; PCR; *Leishmania*; *Nyssomyia whitmani*; *Nyssomyia neivai*.

1. Introduction

Knowledge of the fauna composition, behavior, rates of sandfly natural infection, *Leishmania* species identification, and environmental characteristics of endemic areas is essential for the public-health services that are responsible for protecting populations that live in areas where leishmaniasis is endemic. Leishmaniasis has worldwide distribution. In Brazil, cutaneous leishmaniasis (CL) it has been reported in all states (Brasil, 2007).

Cases of CL have increased significantly since the 1980s, and are appearing over a wider area in Paraná State, southern Brazil (Monteiro et al., 2008, 2009). This disease has been recorded in occupied areas for more than a century, even in urban areas, contrary to expectations that human pressure would eliminate natural foci and reduce the incidence of this endemic disease (Lima et al., 2002; Pessoa and Barreto, 1948; Teodoro et al., 2010). The organization of rural areas in the Brazilian colonial period created environmental conditions that clearly favor CL transmission (Monteiro et al., 2008).

There are several reports of *Leishmania* detection in sandflies in endemic CL areas of Brazil and of the world (Azevedo et al., 1990a, 1990b; Carvalho et al., 2008; Córdoba-Lanús et al., 2006; Galati et al., 1996; Luz et al., 2000; Marcondes et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Parvizi and Ready, 2008; Pita-Pereira et al., 2005, 2009; Saraiva et al., 2009). However, considering the wide geographical distribution of this dermatosis in the Americas (WHO, 2013), knowledge of the natural infection rate of sandflies is still insufficient to estimate the risk of *Leishmania* infection in many endemic areas.

Given the occurrence of autochthonous CL cases in several municipalities in Paraná state, southern Brazil, we investigated natural infection rates of sandflies by *Leishmania* (*Viannia*), in order to identify the species of *Leishmania* present in locations where cases of this disease were reported.

2. Methods

2.1. Sandflies collection

Sandflies were collected in the localities of Recanto Marista, Água Azul Farm and Flor de Maio Grange, in the municipalities of Doutor Camargo, Fênix and Mandaguari, respectively, in Paraná State, southern Brazil, where CL cases were reported. Sandflies were collected from January through September 2006, from 18:00 to 06:00 hs, with Falcão light traps and a Shannon trap, installed in the woods, domiciles, peridomicile, and domestic-animal shelters (cattle shelter and pigsty) (Neitzke et al., 2008). The collected insects were kept alive for further dissection and observation of natural infection by flagellates.

2.2. Dissection and identification of sandflies

The dissection was carried under a stereoscope; the legs and wings were removed and the dissection was carried out by making two incisions in the distal portion of the abdomen and, with zigzag movements, the digestive tubes were removed and examined under optical microscope (400 x) for the search for flagellates and the identification of the species of the sandfly (Neitzke-Abreu et al., 2008). The nomenclature of the species follows Galati (2003).

After dissection and species identification (Neitzke et al., 2008), digestive tubes were stored at -18°C in tubes containing 150 µL STE buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-base; Na₂EDTA-2H₂O 1 mM, pH 8.0), each containing 7 to 12 guts from females of the same species.

2.3. Extraction of DNA

The samples were macerated, and DNA was extracted with a solution of guanidine isothiocyanate and phenol, and hydrated in 20 µL of ultra-pure H₂O (Oliveira et al., 2011). For each group of 22 samples submitted to DNA extraction, were used one negative control (male sandflies) and one positive control [male sandflies plus 10⁴ *L. (V.) braziliensis* promastigotes].

2.4. Multiplex PCR

Two pairs of primers were used: MP3H (5'-GAA CGG GGT TTC TGT ATG C-3') and MP1L (5'-TAC TCC CCG ACA TGC CTC TG-3') (Lopez et al., 1993) to amplify a fragment of 70-bp of the region from the minicircle of the kinetoplast (kDNA) of the *Leishmania* (*Viannia*), and 5Llcac (5'-TGG CCG AAC ATA ATG TTA G-3') and 3Llcac (5'-CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC-3') (Lins et al., 2002) that amplify a fragment of 220-bp from the *IVS6* cacophony gene region of the insects of the genus *Lutzomyia*.

The PCR reaction mixture (final volume 25 µL) was composed of 0.5 µM of each of the primers (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 0.2 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1U Platinum Taq DNA Polymerase, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5 mM MgCl₂, 1X enzyme buffer, and 2 µL DNA template. The amplification was carried out in a PC Thermocycler (Biometra, Germany) at 94°C for 7 min to activate the enzyme, followed by 30 cycles, each divided into three stages, of denaturation (1.5 min at 95°C), annealing (1.5 min at 57°C), and polymerization (2 min at 72°C). After this, the extension was continued for a further 10 min at 72°C, and the tubes were then kept at 4°C until analysis

(Oliveira et al., 2011). The amplification products were submitted to electrophoresis in 2% agarose gel (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) stained with 0.1 µg/mL ethidium bromide, at 10-15 V/cm. The presence of bands was observed in a transilluminator (Macro VueTM UV-20, Hoefer). For every five samples, were added one positive control [reaction mixture plus *L. (V.) braziliensis* DNA] and one negative control (reaction mixture plus water).

3. Results and Discussion

In total, 510 (52 pools) female sandflies were analyzed by dissection and multiplex PCR, including 9 *Migonemyia migonei* (1 pool), 17 *Pintomyia fischeri* (2 pools), 216 *Nyssomyia neivai* (22 pools), and 268 *Nyssomyia whitmani* (27 pools) (Table A). A total of 244 female sandflies were collected at Recanto Marista, 107 at Água Azul Farm, and 159 at Flor de Maio Grange (Table A). These four studied species are frequently found in Brazil (Azevedo et al., 1990a, 1990b; Carvalho et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2005, 2009; Teodoro et al., 2006, 2010).

All 52 sandfly pools contained the 220-bp fragment from the *IVS6* cacophony gene region of the sandflies, and 4 pools (7.7%) showed the 70-bp fragment from the minicircle kDNA of *Leishmania (Viannia)* (Figure A). The infection rate of *Ny. neivai* was 0.46% (1/216), and of *Ny. whitmani* was 1.12% (3/268). At Recanto Marista one *Ny. neivai* pool with *Leishmania* infection was detected on the porch of a domicile; at Água Azul Farm, one *Ny. whitmani* pool was detected in the peridomicile (near the woods); and at Flor de Maio Grange, two *Ny. whitmani* pools were detected, one on the porch of a domicile and another from a domestic-animal shelters. These locations are near the woods and show favorable environment for the formation of sandflies breeding sites. Furthermore, the domestic animals are highly attractive blood sources for female sandflies (Reinhold-Castro et al., 2008, Teodoro et al., 2007a, Teodoro et al., 2007b). The infection rate of Recanto Marista was 0.41% (1/244), of Flor de Maio Grange was 1.26% (2/159), and at Água Azul Farm was 0.93% (1/107).

Both species detected with *Leishmania* infection are widely distributed in Brazil (Carvalho et al., 2008; Carvalho MSL et al., 2010; Carvalho SMS et al., 2010; Costa et al., 2007; Marcondes et al., 1998, 2005) and in Paraná State, where either *Ny. whitmani* or *Ny. neivai* predominate, depending on environmental characteristics (Membrive et al., 2004; Silva et al., 2008; Teodoro et al., 2006, 2010).

Although no flagellates were detected in the dissected sandfly digestive tubes, DNA from *Leishmania (Viannia)* was found in 0.78% (4/510), indicating that at least one infected

sandfly was present in each positive pool. The infected specimens were collected at sites near a riparian forest, which is inhabited by small wild mammals (e.g. rodents, armadillo) that are possible natural reservoirs of *Leishmania*. Natural infection by *Leishmania* has been recorded in *Pi. fischeri* (Pita-Pereira et al., 2011), *Mi. migonei* (Azevedo et al., 1990b; Carvalho MR et al., 2010; Pita-Pereira et al., 2005), *Ny. neivai* (Córdoba-Lanús et al., 2006; Marcondes et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2009; Saraiva et al., 2009), and *Ny. whitmani* (Azevedo et al., 1990a; Carvalho et al., 2008; Galati et al., 1996; Luz et al., 2000), by dissection or PCR, in several localities in many Brazilian states.

Natural infection rates of sandflies by *Leishmania* vary widely: 15.68% in Venezuela by PCR (Jorquera et al., 2005), 0.83% and 7.14% in Brazil by PCR (Carvalho et al., 2008), and 1.4% and 2.6% in Peru by dissection (Kato et al., 2011). Studies on natural infection rates have shown that PCR is more sensitive and specific than dissection to show the presence of *Leishmania* in sandflies (Dinesh et al., 2000; Michalsky et al., 2002; Rodrigues et al., 1999, 2002). This method has often been used in areas where sandfly infection rates are low (Michalsky et al., 2002; Oliveira et al., 2011), due to its sensitivity (it is able to detect the presence of a single parasite), specificity (independently of the number, location and stage of flagellates in the digestive tubes of the vector) (Medeiros et al., 2002; Michalsky et al., 2002; Pita-Pereira et al., 2005), rapidity, and ease of performance enabling it to be used in leishmaniasis epidemiological surveillance (Martín-Sánchez et al., 2006). The dissection of sandflies for detection of flagellates in the digestive tubes needs confirmation by *Leishmania in vitro* culture or inoculation in laboratory animals (Michalsky et al., 2002) while molecular methods allow the identification of *Leishmania* species, isolated in cultures from patients or reservoirs, as well from sandflies (Medeiros et al., 2002; Michalsky et al., 2002).

Several primers have been used (Kato et al., 2005; Michalsky et al., 2002; Pita-Pereira et al., 2005) however, the primers used in this study have been tested successfully in diagnosis and detection of naturally infected sandflies besides having good sensitivity [8 fg/ μ L of *Leishmania (Viannia)*] (Oliveira et al., 2011).

The advantage of employing the multiplex PCR technique is, in addition to the primers for detection of *Leishmania (Viannia)*, the pair of primers used for internal control can assess the presence of probable interference from digestive contents of insects that can inhibit the detection of *Leishmania* (Oliveira et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2005).

The results show the susceptibility of sandflies to *Leishmania* strains, and the minimum infection rates in *Ny. neivai* (0.46%, 1/216) and *Ny. whitmani* (1.12%, 3/268) are low, and might explain the low CL endemicity in the municipalities in question. It is concluded that

Ny. neivai and *Ny. whitmani* are susceptible to infection with *Leishmania*, and that multiplex PCR, because of its sensitivity, specificity and feasibility, can be used in epidemiological studies to detection of natural infection of the sandfly vector.

Acknowledgements

The Colégio Marista, Água Azul Farm, and Flor de Maio Grange for permission to conduct the assessments, and for logistical support.

The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Process 410550/2006-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Araucária for financial support.

References

- Azevedo, A.C.R., Rangel, E.F., Costa, E.M., David, J., Vasconcelos, A.W., Lopes, U.G., 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., 1990b. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85, 479.
- Brasil, 2007. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. URL: <http://goo.gl/mPcbz>. Accessed in 03/28/2013.
- Carvalho, G.M., Andrade-Filho, J.D., Falcão, A.L., Rocha-Lima, A.C., Gontijo, C.M., 2008. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 407-414.
- Carvalho, M.S.L., Bredt, A., Meneghin, E.R.S., Oliveira, C., 2010. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of transmission of American cutaneous leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. Epidemiol. Serv. Saúde 19, 227-237.
- Carvalho, S.M.S., Santos, P.R.B., Lanza, H., Brandão-Filho, S.P., 2010. Diversity of phlebotomine sand flies in Ilheus, state of Bahia, Brazil. Epidemiol. Serv. Saúde 19, 239-244.
- Carvalho, M.R., Valença, H.F., Silva, F.J., Pita-Pereira, D., Araújo-Pereira, T., Britto, C., Brazil, R.P., Brandão-Filho, S.P., 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonomyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the

- putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 116, 108-110.
- Córdoba-Lanús, E., Grosso, M.L., Piñero, J.E., Valladares, B., Salomón, O.D., 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 98, 1-5.
- Costa, S.M., Cechinel, M., Bandeira, V., Zannuncio, J.C., Lainson, R., Rangel, E.F., 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 149-153.
- Dinesh, D.S., Kar, S.K., Kishore, K., Palit, A., Verma, N., Gupta, A.K., Chauhan, D.S., Singh, D., Sharma, V.D., Katoch, V.M., 2000. Screening sandflies for natural infection with *Leishmania donovani*, using a non-radioactive probe based on the total DNA of the parasite. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 447-451.
- Galati, E.A.B., Nunes, V.L.B., Dorval, M.E.C., Oshiro, E.T., Cristaldo, G., Espíndola, M.A., Rocha, H.C., Garcia, W.B., 1996. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 30, 115-128.
- Galati, E.A.B., 2003. Morfologia e Taxonomia, in: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 23-51.
- Jorquera, A., González, R., Marchán-Marcano, E., Oviedo, M., Matos, M., 2005. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 45-48.
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J.D., Barroso, P.A., Gomez, E.A., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 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.
- Kato, H., Gomez, E.A., Cáceres, A.G., Vargas, F., Mimori, T., Yamamoto, K., Iwata, H., Korenaga, M., Velez, L., Hashiguchi, Y., 2011. Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 515-521.

- Lima, A.P., Minelli, L., Teodoro, U., Comunello, E., 2002. Tegumentary leishmaniasis distribution by satellite remote sensing imagery, in Paraná state, Brazil. *An. Bras. Dermatol.* 77, 681-692.
- Lins, R.M., Oliveira, S.G., Souza, N.A., Queiroz, R.G., Justiniano, S.C., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol. Biol.* 11, 117-122.
- Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C., Arevalo, J., 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., Membrive, N., Castro, E.A., Dereure, J., Pratlong, F., Dedet, J.A., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V., 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 623-631.
- Marcondes, C.B., Lozovei, A.L., Vilela, J.H., 1998. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 51-58.
- Marcondes, C.B., Conceição, M.B.E., Portes, M.G.T., Simão, B.P., 2005. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian state of Santa Catarina - preliminary results (Diptera: Psychodidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 353-355.
- Marcondes, C.B., Bittencourt, I.A., Stoco, P.H., Eger, I., Grisard, E.C., Steindel, M., 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.
- Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Barón, S., Castillejo, S., Morillas-Marques, F., 2006. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 527-532.
- Medeiros, A.C.R., Rodrigues, S.S., Roselino, A.M.F., 2002. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 421-424.
- Membrive, N.A., Rodrigues, G., Membrive, U., Monteiro, W.M., Neitzke, H.C., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., Teodoro, U., 2004. Sandflies of municipalities in north of Paraná state, south of Brazil. *Entomol. Vect.* 11, 673-680.

- Michalsky, É.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., Dias, E.S., 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 44, 255-259.
- Monteiro, W.M., Neitzke, H.C., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., Ferreira, M.E.M.C., Teodoro, U., 2008. Geographic distribution and epidemiological features of American tegumentary leishmaniasis in old rural settlements in Paraná state, southern Brazil. Cad. Saúde Pública 24, 1291-1303.
- Monteiro, W.M., Neitzke, H.C., Silveira, T.G.V., Lonardoni, M.V.C., Teodoro, U., Ferreira, M.E.M.C., 2009. Poles of American tegumentary leishmaniasis production in northern Paraná state, Brazil. Cad. Saúde Pública 25, 1083-1092.
- Neitzke, H.C., Scodro, R.B.L., Reinhold-Castro, K.R., Dias-Sversutti, A.C., Silveira, T.G.V., Teodoro, U., 2008. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the state of Paraná. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41, 17-22.
- Oliveira, D.M., Reinhold-Castro, K.R., Bernal, M.V.Z., Legriffon, C.M.O., Lonardoni, M.V.C., Teodoro, U., Silveira, T.G.V., 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.
- Parvizi, P., Ready, P.D., 2008. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Trop. Med. Int. Health 13, 1159-1171.
- Pessoa, S.B., Barreto, M.P., 1948. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional - São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo.
- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., Figueiredo-Barbosa, A., Britto, C.C., 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., Souza, G.D., Zwetsch, A., Alves, C.R., Britto, C., Rangel, E.F., 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., Souza, G.D., Pereira, T.A., Zwetsch, A., Britto, C., Rangel, E.F., 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 Trop.* 120, 273-275.
- Reinhold-Castro, K.R., Scodro, R.B.L., Dias-Sversutti, A.C., Neitzke, H.C., Rossi, R.M., Kuhl, J.B., Silveira, T.G.V., Teodoro, U., 2008. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 269-276.
- Rodriguez, N., Aguilar, C.M., Barrios, M.A., Barker, D.C., 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 47-49.
- Rodriguez, N., Lima, H., Aguilar, C.M., Rodriguez, A., Barker, D.C., Convit, J., 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 105-109.
- 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., 2009. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J. Med. Entomol.* 46, 1159-1163.
- Silva, A.M., Camargo, N.J., Santos, D.R., Massafra, R., Ferreira, A.C., Postai, C., Cristóvão, E.C., Konolsaisen, J.F., Bisetto-Jr, A., Perinazo, R., Teodoro, U., Galati, E.A.B., 2008. Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 37, 209-225.
- 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., 2006. Preliminary information on sandflies in the north of Paraná state, Brazil. *Rev. Saúde Publica* 40, 327-330.
- Teodoro, U., Santos, D.R., Santos, A.R., Oliveira, O., Poiani, L.P., Kuhl, J.B., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., Monteiro, W.M., Neitzke, H.C., 2007a. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Publica* 23, 2597-2604.
- Teodoro, U., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., Dias, A.C., Abbas, M., Alberton, D., Santos, D.R., 2007b. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Publica* 41, 383-388.

- Teodoro, U., Santos, D.R., Silva, A.M., Massafera, R., Imazu, L.E., Monteiro, W.M., Neitzke-Abreu, H.C., 2010. Sandfly fauna in counties of the pioneer north of Paraná state, Brazil. *Rev. Patol. Trop.* 39, 322-330.
- WHO, 2013. World Health Organization. Leishmaniasis. URL: <http://goo.gl/PiM9n>. Accessed in 03/28/2013.

Table A - Sandflies collected in Recanto Marista, Água Azul Farm, and Flor de Maio Grange, southern Brazil, from January to September, 2006.

Specimens/Localities (Municipalities)		Recanto Marista (Doutor Camargo)	Água Azul Farm (Fênix)	Flor de Maio Grange (Mandaguari)	Total
<i>Migonemyia migonei</i>	N ^a	9	0	0	9
	Positive pools / Pools ^b	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	N ^a	19	97	152	268
	Positive pools / Pools ^b	0/2	1/10	2/15	3/27
<i>Nyssomyia neivai</i>	N ^a	216	0	0	216
	Positive pools / Pools ^b	1/22	0/0	0/0	1/22
<i>Pintomyia fischeri</i>	N ^a	0	10	7	17
	Positive pools / Pools ^b	0/0	0/1	0/1	0/2
Total	N ^a	244	107	159	510
	Positive pools / Pools^b	1/25	1/11	2/16	4/52

^aNumber of Specimens; ^bNumber of positive pools / number of pools composed. Each pool contained 7 to 12 guts from females of the same species.

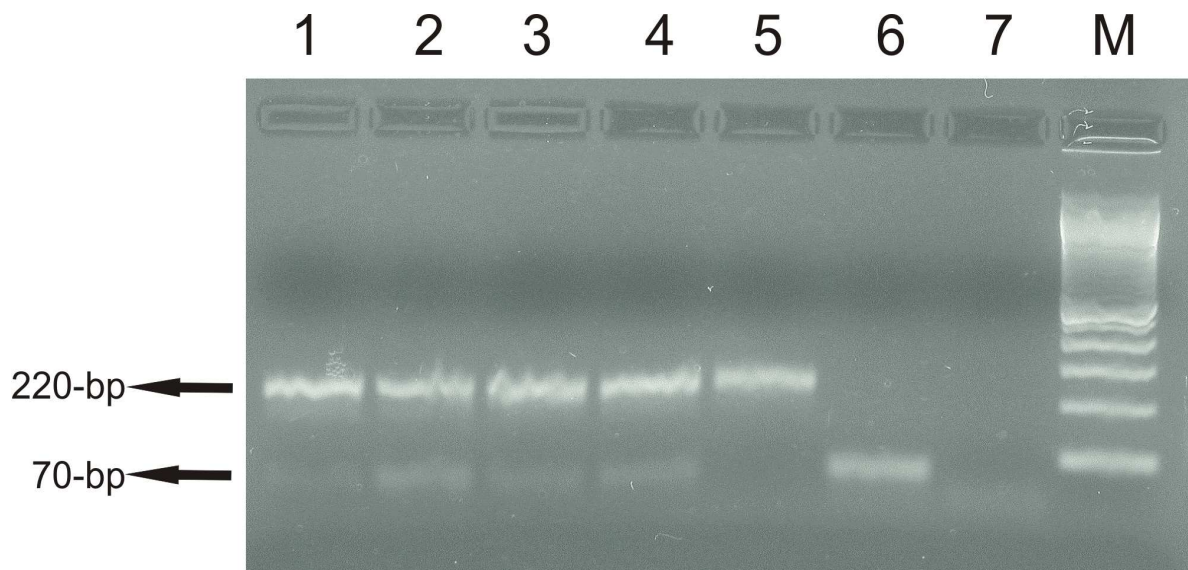


Figure A - Multiplex PCR in 2% agarose gel showing fragments of 70-bp and 220-bp.

The fragment of 70-bp of the kDNA minicircle region of subgenus *Leishmania* (*Viannia*) were amplified with MP3H and MP1L primers. The fragment of 220-bp of the IVS6 cacophony gene region of the insects of the genus *Lutzomyia* were amplified with 5Llcac and 3Llcac primers. Lane 1, *Ny. whitmani* DNA sample collected in Fênix; lanes 2, 3 and 5, *Ny. whitmani* DNA samples collected in Mandaguari; lane 4, *Ny. neivai* DNA sample collected in Doutor Camargo; lane 6, positive control [DNA from *L. (V.) braziliensis* promastigotes]; lane 7, negative control (all reagents without DNA). M, 100-bp molecular marker (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil).

**Artigo 3: “DETECTION OF DNA FROM *LEISHMANIA* (*VIANNIA*): ACCURACY OF
POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DIAGNOSIS OF CUTANEOUS
LEISHMANIASIS”**

Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

Herintha Coeto Neitzke-Abreu¹, Mateus Sabaini Venazzi², Marcos Vinicius Zandonadi Bernal², Kárin Rosi Reinhold-Castro¹, Fernanda Vagetti², Camila Alves Mota², Naielly Rodrigues Silva², Sandra Mara Alessi Aristides², Thaís Gomes Verzignassi Silveira², and Maria Valdrinez Campana Lonardoni^{2*}

¹ Health Sciences Postgraduate Program (PCS), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, State of Paraná, Brazil

² Department of Clinical Analysis and Biomedicine (DAB), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, State of Paraná, Brazil

* E-mail: mvclonardoni@uem.br

Abstract

Cutaneous leishmaniasis (CL) can occur in skin and mucosa, causing disfiguring lesions. The laboratory diagnosis of CL involves immunological methods and optical detection of the parasite, all of which have limitations. There is a need for more effective diagnostic methods for CL which will allow treatment to be initiated more promptly in order to help prevent the development of severe forms of mucosal disease, and to estimate the prognosis of the infection. The polymerase chain reaction (PCR) has been widely used to diagnose CL, because of its higher sensitivity. This study estimated the accuracy and compared PCRs of samples from lesion scarification (PCR-L) and blood sample-enriched leukocytes (PCR-B) with three conventional diagnostic techniques: parasite direct search (DS), Montenegro skin test (MST), and indirect immunofluorescence reaction (IIF). The study included 276 patients under suspicion of CL. We conducted a cross-sectional study, in which patients were selected by convenience sampling. We used MP3H/MP1L primers to generate a *Leishmania (Viannia)* (minicircle kDNA) fragment of 70-bp. Of 106 patients with CL, 83.87%, 51.67%, 64.52%, 85.71%, or 96.10% tested positive by PCR-L, PCR-B, DS, IIF, or MST, respectively. Five patients tested positive only by PCR-L, and two other patients only by PCR-B. PCR-L is indicated for use in patients with chronic lesions or *Leishmania* reinfection, which may progress to mucosal lesion. PCR-B is indicated for use in patients with negative results in conventional tests or for patients with no apparent lesion. PCR is not only useful in diagnosing CL but also helps to identify the infecting species.

Introduction

Leishmaniasis are protozooses that are found in 88 countries, with approximately 14 million infected people [1]. Some forms of leishmaniasis may cause destructive and disabling injuries, which can lead to death [2].

Cutaneous leishmaniasis (CL) is recognized by the cutaneous form. In Brazil, CL cases are mainly due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which causes lesions that if left untreated might result in the mucosal form, which is characterized by disfiguring lesions [2] that can destroy cartilage [3]. Accurate and early diagnosis is important in cases of CL caused by *L. (V.) braziliensis*, and involves laboratory tests to detect the parasite (direct search, culture, animal inoculation, and histopathology) and immunodiagnostic techniques (detection of cellular immune response, antibody, and immune-complexes antigen) [4].

The standard diagnosis of CL is accomplished by demonstrating the presence of the parasite [2], although the methods that are currently used have limitations [5]. Histopathology, an invasive technique, and direct parasite search (DS) have low positivity; they depend on the number of parasites in a sample, and have limited application in patients with old lesions or patients who show no lesions [2].

Methods involving isolation of the parasite in culture and inoculation in animals can be used; however, their performance depends on the species of *Leishmania*, and the culture media may become heavily contaminated with bacteria [6]. The use of experimental animals is complicated by the long period of time required for the lesion to evolve [2] and the ethical aspects involved. Therefore, culture and animal inoculation are not practical for routine laboratory diagnosis.

Serological tests for antibodies are often used to diagnose CL. Although they are easy to perform, serological methods show higher rates of negativity in patients with only one lesion or with lesions less than six months old [2].

The Montenegro skin test (MST) has been reported to show high rates of positivity [7,8,9]. However, in HIV-positive patients, MST shows a false negative result due to the lack of a cellular immune response against parasite antigens [2]. Furthermore, MST is an invasive technique, may give a positive result in latent infections, and does not distinguish a former from a current infection [8,10].

The presence of different *Leishmania* species with similar clinical characteristics in endemic areas requires the development of more accurate and sensitive laboratory methodologies to identify these species, in order to assess the CL prognosis and allow the selection of an appropriate therapy [11,12]. Species identification also contributes to better understanding of CL epidemiology [13]. The Polymerase Chain Reaction (PCR), because of its high sensitivity, has been widely used to detect and identify *Leishmania* species in different clinical samples [8,9,14,15,16,17,18].

Although this disease has been extensively studied, some aspects remain unknown and still under discussion. It is necessary to improve the diagnosis of CL by identifying the species involved, in order to provide more rapid, safer, and more appropriate treatment, as well as to determine the prognosis of the infection. The aim of this study was to estimate the accuracy of PCR in biological samples obtained by scarification of lesions and from peripheral-blood leukocytes, comparing this with other conventional techniques used to diagnose CL, because, although DS is the reference technique for CL diagnosis, its diagnostic value remains uncertain.

Methods

Ethical Statement. The present study received approval from the Permanent Committee for Ethics in Research involving Humans (Process No. 533/2009) of the Universidade Estadual de Maringá. All participants were informed about the importance and objectives of the study, and were assured of both anonymity and confidentiality. We obtained written informed consent from patients who agreed to participate, or from the parents or guardians of patients who were minors. All procedures involving humans were conducted according to protocols approved by the National Health Council of the Brazilian Ministry of Health (Resolution No. 196/1996).

Patient selection. The study included 276 patients under suspicion of CL, who were referred by the 15th Regional Health Unit of Paraná (Brazil) to the Laboratory for Teaching and Research in Clinical Analysis of the Universidade Estadual de Maringá (UEM), which is the reference laboratory of the Brazilian Ministry of Health for diagnosis of CL, during the period from June 2010 through November 2011. The study used a cross-sectional design, in which patients were selected by convenience sampling. We excluded 53 patients for whom at least one of the PCR analyses (lesion and/or blood) had not been performed (Figure 1). For all patients at least one conventional test and one of the molecular tests were performed. The patients completed a questionnaire that included clinically and epidemiologically relevant information. After the laboratory tests were performed, the patients returned to their referring physician for treatment.

Conventional laboratory diagnosis. The methods were performed by a trained and qualified professional.

Direct parasite search (DS). Material from the edge of the lesion was obtained by scarification after asepsis, with a non-metallic DNA spatula (previously treated with 1.5% sodium hypochlorite solution for 15 min and flame-sterilized). For detection of amastigotes of *Leishmania* sp., the glass slides containing the samples were fixed with methanol, stained with Giemsa, and analyzed by optical microscopy [8].

Indirect Immunofluorescence (IIF). Venous blood was used for detection of IgG anti-*Leishmania*. The antigens used were promastigotes of *L. (V.) braziliensis*

(MHOM/BR/1987/M11272), and conjugated anti-human immunoglobulin G - fluorescein (Biolab-Mérieux, Brazil). Titers ≥ 40 were considered positive [19].

Montenegro skin test (MST). 0.1 mL of antigen was injected intradermally in the arm of each patient. The site was evaluated after 48 h, and the presence of a papule ≥ 5 mm in diameter was considered a positive result [3,8]. All samples were collected prior to administration of the MST.

Molecular diagnostics

Obtaining lesion DNA. Material from the edge of the lesion obtained by scarification was placed in two tubes free of RNAses and DNAses, containing 50 μ L of STE buffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0). Samples were incubated at 95°C for 30 min in a PC Thermocycler (Biometra, Germany), centrifuged at 13,000 g for 1 min, and the supernatant was stored at -18°C until PCR (PCR-L) [8].

DNA extraction from blood. 3 mL of venous blood was used to obtain leukocytes: blood was added to 1 mL of 10% EDTA and 6% Dextran (T500) [20]. The supernatant was removed after 1 h, divided into two tubes, and centrifuged at 200 g for 10 min. The pellet was washed with 0.15 M NaCl, centrifuged at 200 g for 10 min, resuspended with 125 μ L of 0.15 M NaCl and 125 μ L of ACD (25 mM citric acid, 50 mM sodium citrate, 81 mM D-glucose) and stored at -18°C for DNA extraction and PCR (PCR-B). Leukocyte-enriched samples were washed with PBS (saline solution buffered with 10 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.2) and centrifuged at 3,500 g for 15 min. DNA was extracted by the guanidine-phenol method [9] and resuspended in 50 μ L of TE buffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0). A positive control (blood from individuals without CL plus 10^4 *L. (V.) braziliensis* promastigotes) and a negative control (blood from individuals without CL) were included.

PCR for amplification of *Leishmania* DNA. The primers MP3H (5'-GAA TTC GGT TGT CGG ATG C-3') and MP1L (5'-ACA TAC GCC TCC CTC TGC TG-3') [21] were used to amplify a 70-bp fragment from the kDNA minicircles of subgenus *Leishmania* (*Viannia*). The reaction mixture (final volume 25 μ L) was composed of 1 μ M of each primer (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 1.5 mM $MgCl_2$, 1 x enzyme buffer, 0.2 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 5 μ L of DNA obtained from a lesion or 2 μ L of DNA extracted from blood. DNA amplification was carried out in a PC Thermocycler (Biometra, Germany) at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles: 1.5 min at 95°C, 1.5 min at 55°C, and 2 min at 72°C; finally for 10 min at 72°C. The product was kept at 4°C until analysis. Ten microliters of amplified

products was submitted to electrophoresis in 3% agarose gel (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), stained with 0,1 µg/mL ethidium bromide, at 10-15 V/cm. A positive control [1 pg of *L. (V.) braziliensis* DNA] and a negative control (water) were added. The presence of bands was observed in a transilluminator (Macro Vue™ UV-20, Hoefer).

Internal amplification control. The samples (blood and lesion) with negative PCR results for *Leishmania* were submitted to PCR for the presence of inhibitors. Specific primers for the human β -globin were used, which amplify a fragment of 268-bp (GH20: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3', and PC04: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') [22]. The analytical sensitivity was assessed using a sample of DNA from the lesion, measured by a Qubit™ Fluorometer Kit (Invitrogen, USA), and serially diluted (500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg). The reaction mixture (final volume 25 µL) was composed of 1 mM of each primer (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 3 mM MgCl₂, 1 x enzyme buffer, 0.2 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil) and 2 µL of DNA. The PCR was carried out in a PC Thermocycler (Biometra, Germany) by 40 cycles: 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C; finally for 10 min at 72°C. The product was kept at 4°C until analysis. Ten microliters of amplified products was submitted to electrophoresis in 2% agarose gel (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), stained with ethidium bromide. The bands were observed in a transilluminator (Macro Vue™ UV-20, Hoefer).

Statistical analysis. The PCR-L and PCR-B results were compared with conventional methods using McNemar's test with the program Statistica 7.1, considering $p \leq 0.05$ to be significant. The proportions were analyzed using a Mid-p exact test OpenEpi version 2.3, with a confidence interval of 95% (95% CI). Sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were determined for the DS test.

Results

We studied 223 patients who were under suspicion of CL and residents of endemic areas; 70.40% were men and 29.60% were women. The majority (82.51%) were more than 30 years of age, and lived in urban areas (83.52%); however, the infections occurred mainly in patients from rural areas (62.42%).

In the 223 patients suspected of CL, 91.48% had skin lesions, in most cases a single lesion (65.97%). The evolution of lesions over time ranged from 1 week to 10 years, and the

majority (54.08%) up to three months. Mucosal changes occurred in 8.52% of patients, and their evolution over time ranged from 2 months to 20 years, the majority within 2 years. All 223 patients were tested by PCR methods (lesion and/or blood), but not all patients were given one of the three conventional tests.

PCR-L was positive in 42.56% (83/195) and PCR-B 28.70% (33/115). DS was positive in 30.46% (60/197), IIF in 40.91% (90/220), and MST in 44.31% (74/167). The IIF resulted in titers ≤ 320 and MST papule diameter ≤ 30 mm. PCR-L showed higher positivity than DS ($p=0.0001$), IIF ($p=0.0203$), and showed no significant difference compared to MST ($p=0.1208$). PCR-B detected fewer positive samples than DS ($p=0.0003$), IIF ($p=0.0058$), and MST ($p=0.0158$).

PCR carried out with GH20 and PC04 primers showed a detection limit of 50 fg DNA. All negative PCR samples for *Leishmania* were positive in the PCR for internal amplification control, excluding PCR inhibitors in these samples (Figure 2).

In the 223 patients, 106 (47.53%) were diagnosed positive for CL. Those individuals with at least one conventional positive test (DS, IIF, MST) were considered to be infected with *Leishmania*. In these patients, PCR-L was positive in 83.87% (78/93) and PCR-B in 51.67% (31/60); whereas DS was positive in 64.52% (60/93), IIF in 85.71% (90/105), and MST in 96.10% (74/77). PCR-L showed a higher positivity rate than DS ($p=0.0000$), and lower than IIF ($p=0.0000$) and MST ($p=0.0000$). PCR-B showed no significant difference from DS ($p=0.2300$), and detected fewer positive samples than IIF ($p=0.0000$) and MST ($p=0.0002$).

PCR-L was positive in 100% (95% CI; 95.05-100.00) of patients with a positive DS, in 54.55% (95% CI; 37.53-70.79) with a negative DS, and in 69.23% (95% CI; 41.30-89.37) with a negative IIF. PCR-B was positive in 65.63% (95% CI; 48.12-80.42) of patients with a positive DS, in 13.33% (95% CI; 2.30-37.52) with a negative DS, and in 60.00% (95% CI; 18.24-92.65) with a negative IIF (Table 1).

In 106 patients with CL, 96 had the cutaneous form. In these, PCR-L was positive in 84.44% (76/90) (95% CI; 75.84-90.86), and PCR-B in 50.00% (25/50) (95% CI; 36.34-63.66); whereas DS was positive in 65.93% (60/91) (95% CI; 55.76-75.11). In five patients, PCR-L and DS were not performed, and PCR-B was positive in 60.00% (3/5) of these patients (95% CI; 18.24-92.65). In 10 patients with the mucosal form, PCR-L was positive in 66.67% (2/3) (95% CI; 13.20-98.33), PCR-B in 60.00% (6/10) (95% CI; 29.11-85.77), and 0.00% in DS (0/2) (95% CI; 00.00-77.64).

Of 117 patients suspected of CL who did not show positive results in one or more of the conventional tests, five showed a positive PCR-L, and two others showed a positive PCR-B.

DS positivity was significantly higher in patients with lesions less than one year old, and PCR-L, PCR-B, IIF, and MST positivity did not differ over different lesion evolution times (Table 2).

The PCR-L sensitivity was similar to the MST sensitivity. The PCR-B sensitivity did not differ from the IIF sensitivity, but was significantly lower than MST and PCR-L. PCR-B showed higher specificity values and PPV than IIF, MST, and PCR-L. The best values of NPV were obtained from MST and PCR-L; there was no significant difference between the NPV of PCR-L and IIF (Table 3).

Discussion

CL is a serious public-health problem that can lead to destructive, disfiguring and disabling lesions, and even to death, mainly due to a delay in diagnosis and inadequate treatment [2,3]. Faster, more-reliable, and more-specific methods of laboratory diagnosis are needed in order to begin treatment promptly, ensure correct species identification, and differentiate CL from other diseases with similar clinical signs [3,23].

PCR has been evaluated in endemic areas and offers advantages over conventional tests; it is more specific, sensitive, versatile, and faster [24]. PCR has shown good sensitivity in studies on *Leishmania*, and has been used with material from culture [15], lesions [8,10,17,23,24,25,26,27], blood [9,24,28,29,30,31], and sandflies [16,18].

The choice of primers for the PCR test for *Leishmania* is important because it influences the sensitivity of the technique, and can allow differentiation of species of the subgenera *Viannia* and *Leishmania* [30,32]. PCR with MP3H/MP1L primers shows good sensitivity in detecting members of the subgenus *Leishmania* (*Viannia*), and can detect 2 fg of DNA [32], making this technique suitable for CL diagnosis [25,26].

PCR with GH20 and PC04 primers showed good sensitivity and can be used effectively as an internal control for human samples, excluding PCR inhibitors.

In this study, PCR-L showed high positivity (83.87%) in patients with CL, and was significantly more efficient than DS, confirming other studies [8,24,27]. The evaluation parameters of diagnostic tests showed 100% sensitivity and NPV in PCR-L. However, a negative PCR result with MP3H/MP1L primers does not eliminate the possibility of infection by *L. (L.) amazonensis*, which has been reported in northern Paraná [33].

PCR-B showed 51.67% positivity. Parasite DNA has been detected in blood infrequently, and other investigators have reported that PCR in blood showed low positivity [9,31]. In this study, evaluation of the parameters for the diagnostic tests showed that PCR-B had the highest rate of specificity and PPV, compared to the other tests.

Although DS is rapid and easy to perform, it has limited application in patients without lesions or with old lesions, because the possibility that the parasite is present is inversely proportional to the age of the lesion [2]. Furthermore, DS does not distinguish the species of *Leishmania*. In this study, DS showed 64.52% positivity in CL patients; however, positivity was very low in patients with lesions older than 12 months. Other investigators have reported similar positive results, with higher rates of positivity in lesions with less than 3 months of evolution [7,8,34].

The IIF was positive in 85.71%, showing a good positivity rate in patients with both recent and old lesions, which is consistent with other reports [7]. However, serological methods may show cross-reactivity with Chagas' disease [2,6], which is common in Brazil, and show higher rates of negativity in patients with only one lesion or with lesions less than 6 months old [2].

MST has been reported to show high positivity rates [7,8,9], in agreement with our finding of a positivity rate of 96.10%. However, MST is an invasive technique, may give a positive result in latent infections, and does not distinguish a past from a current infection [8,10,34]. This may explain the four patients who showed positive results only with the MST technique.

The majority of leishmaniasis cases in Paraná are caused by *L. (V.) braziliensis*, which has the potential to develop a mucosal form [2,19] and can be fatal if left untreated. The occurrence of mucosal leishmaniasis ranges from 3 to 5% of cases of infection by *L. (V.) braziliensis* [3]. In Paraná, 290 cases of CL were reported in 2010, with 67 (23.10%) cases of mucosal leishmaniasis. This proportion varies by region, and in some municipalities, 100% of the cases are the mucosal form. The parasites may persist for years in the host [35,36] and hematogenous and lymphatic dissemination can occur [28,31], mainly by leukocytes. This is the most probable mechanism to explain the occurrence of metastatic forms (mucosal and recurrent cutaneous lesions).

Two patients who showed only a positive PCR-B had the cutaneous form and had not previously been diagnosed with CL, although they were residents of endemic areas. Other investigators have reported cases of positive results with IIF and enzyme immunoassay [37] and with PCR [28] in the blood of patients who had never had CL, but lived in endemic areas;

this may explain the possibility of latent infection in asymptomatic (subclinical) carriers of *L. (V.) braziliensis*.

Five patients who showed a positive PCR-L and negative conventional tests had the cutaneous form, with active lesions lasting from 2 weeks to 2 years. Four of these patients have had CL in the past, ranging from 10 months to 8 years previously; the remaining patient, who lived in an endemic area, denied a past infection. Cases of positive PCR have been reported in samples from lesions [17], scars [38], and gingiva [39] from patients who were previously infected with and treated for *L. (V.) braziliensis*, which may explain the persistence of the infection. It must be remembered that a finding of their DNA does not imply that viable parasites are present, and that a positive PCR does not distinguish active from past infections.

CL cases (positive DS and/or PCR-L) that show a negative IIF and MST may indicate the possibility that the parasite has disseminated due to a poor host immune response [3]. In this study, five patients showed a positive PCR-L but negative IIF and MST. Such cases should be monitored, and PCR-B may be an important tool to detect possible spreading, since DS and PCR-L tend to become negative because of treatment or evolution of the lesion over time, and healing of the lesion may make these tests inviable. Investigation of *L. (V.) braziliensis* in peripheral blood has been suggested as a means of predicting a relapse [24], and for follow up and monitoring the clinical status of chemotherapy patients [30]. In 110 patients, none of the tests gave a positive result for CL, which suggests that clinical tests need to be improved; these patients returned to their physician for further evaluation.

Different types of clinical samples may vary widely in PCR sensitivity. PCR using whole blood [29,30,31] may show interference, resulting in low sensitivity, as also may occur with PCR using "buffy coat" samples [9,28,30,31] or mononuclear cells [24,31]. The leukocyte separation technique used in this study reduced the number of erythrocytes and other inhibitors, and also provided for the concentration of potential carrier cells of *Leishmania* and increased the PCR sensitivity. The methodology for obtaining leukocytes (EDTA/Dextran solution) effectively increased the number of these cells (4,300 leukocytes/mm³ of blood). Several studies have evaluated the use of PCR in the diagnosis of CL; however, ours is the first study employing leukocytes concentrated from peripheral blood obtained with dextran solution.

The use of a combination of different methodologies to improve the diagnosis of CL has been suggested [19,40], and the choice of the methods used also depends on the evolution of the lesion or infection over time [2,7]. However, conventional techniques do not reveal the infecting species. Patients with suspected CL must receive a definitive diagnosis, because

they can progress to the potentially fatal mucosal form if left untreated. Therefore, there is a need for more sensitive methods that can be employed to follow patients and monitor their cure. At the present time, the finding of the parasite by DS is considered the only definitive diagnosis of CL [2], but this method has low sensitivity, which limits its use as a reference technique.

In view of several considerations, that: (i) the parasites can persist for years in the host; (ii) the chance of finding the parasite by DS is inversely proportional to the evolution of the lesion over time; (iii) MST is invasive; and (iv) negative IIF and MST in CL patients may suggest that the parasite has spread, it is necessary to continue research to develop more-sensitive and more-specific methods for diagnosis and evaluating the prognosis of CL. PCR-L is an alternative method for the diagnosis of CL, especially in patients with chronic lesions or who have received a specific treatment, or in patients with reinfection or a relapse of infection with *L. (V.) braziliensis*, which may evolve into a mucosal lesion. PCR-B using DNA from concentrated leukocytes showed a sensitivity comparable to that of DS, and showed a higher rate of positivity than the PCR techniques using blood that were described in other studies. This technique may be indicated in patients suspected of CL who have a negative result in conventional tests, or in patients with no lesion. Given that the detection of DNA is a reliable indication of the presence of the parasite, PCR is a useful tool for diagnosis and epidemiology of CL, and has the advantage of identifying the infecting species.

References

1. World Health Organization (2010) Control of the leishmaniases. Available: <http://goo.gl/1WxXs>. Accessed 10 November 2012.
2. Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Cutaneous Leishmaniosis. Rev Soc Bras Med Trop 36: 71-80.
3. Brasil Ministry of Health (2007) Manual for the surveillance of American cutaneous leishmaniasis. Available: <http://goo.gl/mPcbz>. Accessed 10 November 2012.
4. Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG (1999) Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. Clin Dermatol 17: 291-296.
5. Ridley DS, De Magalhães AV, Marsden PD (1989) Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. J Pathol 159: 293-299.

6. Vexenat AC, Santana JM, Teixeira AR (1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Inst Med Trop São Paulo 38: 177-185.
7. Silva CEA (2008) Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in patients from endemic areas. Masters dissertation of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.
8. Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC, et al. (2006) Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the dianosis of human American tegumentary leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 427-430.
9. Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC, et al. (2007) Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol 115: 399-402.
10. Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz-Junior AC, Campos LF, et al. (2005) Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. Acta Trop 94: 55-59.
11. Wortmann G, Hochberg L, Houngh HH, Sweeney C, Zapor M, et al. (2005) Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. Am J Trop Med Hyg 73: 999-1004.
12. Jirkù M, Zemanová E, Al-Jawabreh A, Schönián G, Lukes J (2006) Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. Diagn Microbiol Infect Dis 55: 75-79.
13. Aoun K, Amri F, Chouihi EA, Haouas N, Bedoui K, et al. (2008) Epidemiology of *Leishmania (L.) infantum*, *L. major* and *L. killicki* in Tunisia: results and analysis of the identification of 226 human and canine isolates. Bull Soc Pathol Exot 101: 323-328.
14. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES (2002) Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop São Paulo 44: 255-259.
15. Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardoni MVC, Silveira TGV (2008) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. Exp Parasitol 120: 300-305.
16. Neitzke HC, Scodro RBL, Reinhold-Castro KR, Dias-Sversutti AC, Silveira TGV, et al. (2008) Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. Rev Soc Bras Med Trop 41: 17-22.

17. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio LF, et al. (2010) Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 109-112.
18. Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, Legriffon CMO, Lonardoni MVC, et al. (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.
19. Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, et al. (1999) Observations on laboratory diagnosis and cutaneous leishmaniasis epidemiology in the State of Paraná State, South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 413-423.
20. Kanegae MPP, Ximenes VF, Falcão RP, Colturato VAR, Mattos ER, et al. (2007) Chemiluminescent determination of leukocyte alkaline phosphatase: an advantageous alternative to the cytochemical assay. *J Clin Lab Anal* 21: 91-96.
21. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, et al. (1993) Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 49: 348-356.
22. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
23. Isaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SHE, Barker DC (2002) Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 165-168.
24. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E (1998) Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 102-109.
25. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N (1998) Single-step multiplex PCR for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 36: 1989-1995.
26. Aviles H, Bell A, Armijos R, Monroy FP, Harris E (1999) PCR detection and identification of *Leishmania* parasite in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 85: 181-187.
27. Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF (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.

28. Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Añez N, et al. (1994) Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. Clin Diag Lab Immunol 1: 385-389.
29. Mathis A, Deplazes P (1995) PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J Clin Microbiol 33: 1145-1149.
30. Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR (2000) Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. J Clin Microbiol 38: 748-751.
31. Camera PO, Jungera J, Piresa FESS, Mattosb M, Oliveira-Neto MP, et al. (2006) Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 100: 1112-1117.
32. Oliveira DM, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV (2011) Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Braz J Infect Dis 15: 204-210.
33. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Lonardoni MVC, Dias MLGG, et al. (1990) 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 85: 475-476.
34. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ (2001) Simple form clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 65: 902-906.
35. Guevara P, Ramírez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, et al. (1993) *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. Lancet 341:1341.
36. Ramírez JL, Guevara P (1997) Persistent Infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 333-338.
37. Arraes SMA, Marini MT, Martello D, Silveira TGV, Lonardoni MVC, et al. (2008) Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases following an outbreak in an endemic area. Rev Soc Bras Med Trop 41: 205-208.
38. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, et al. (2004) Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure?. J Infect Dis 189: 1018-1023.

39. Premoli-de-Percoco G, Gonzalez N, Añez N, Guevara P, Ramirez JL (2002) PCR detection of specific *Leishmania*-DNA in patients with periodontal disease. *Pathologica* 94: 28-31.
40. Manson-Bahr PE (1987) Diagnosis. In: Peters W, Kilich-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis*. London: Academic Press. pp. 703-728.

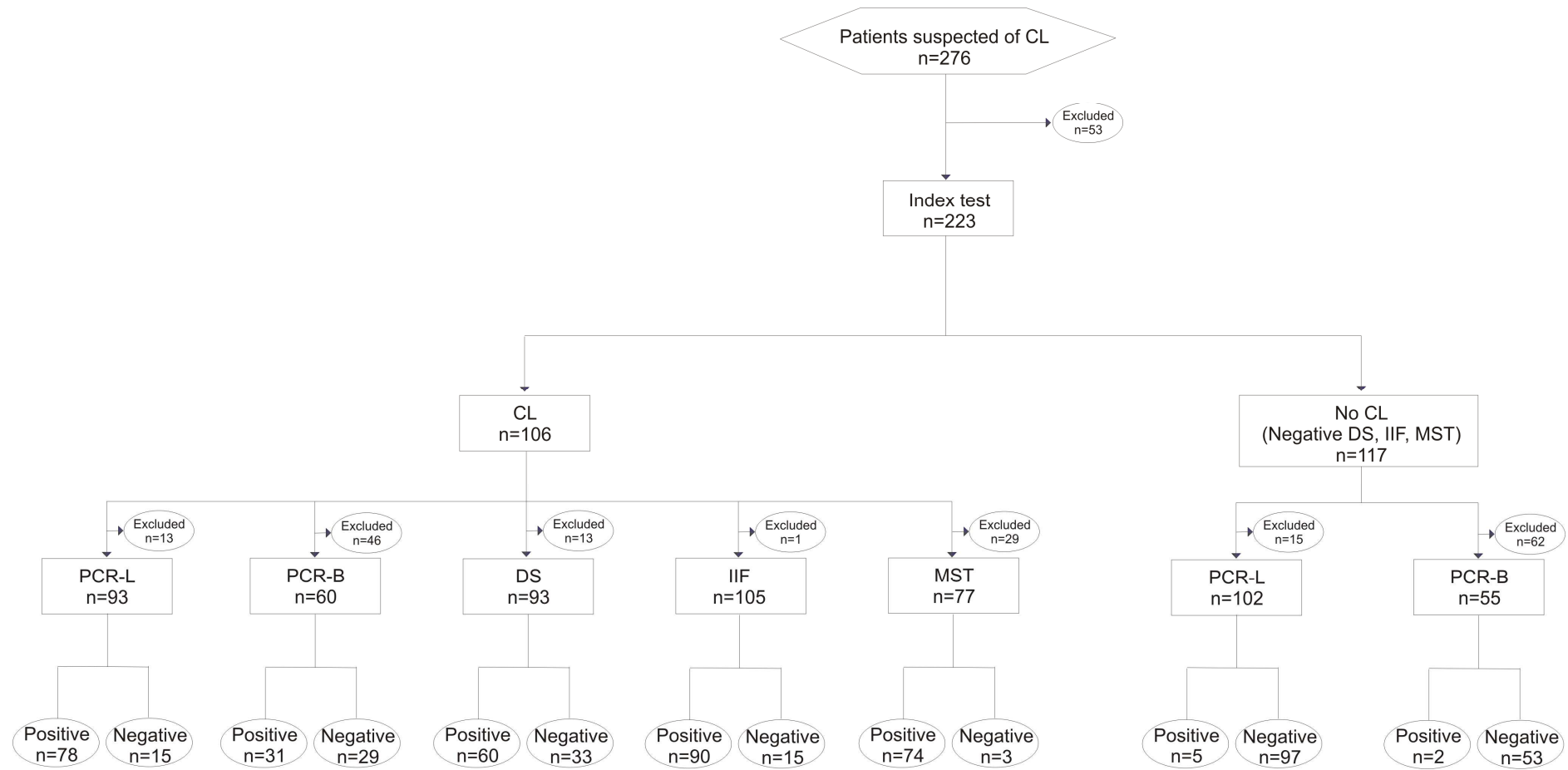


Figure 1. Flow diagram of patients to estimate the accuracy of PCR in the diagnosis of CL.

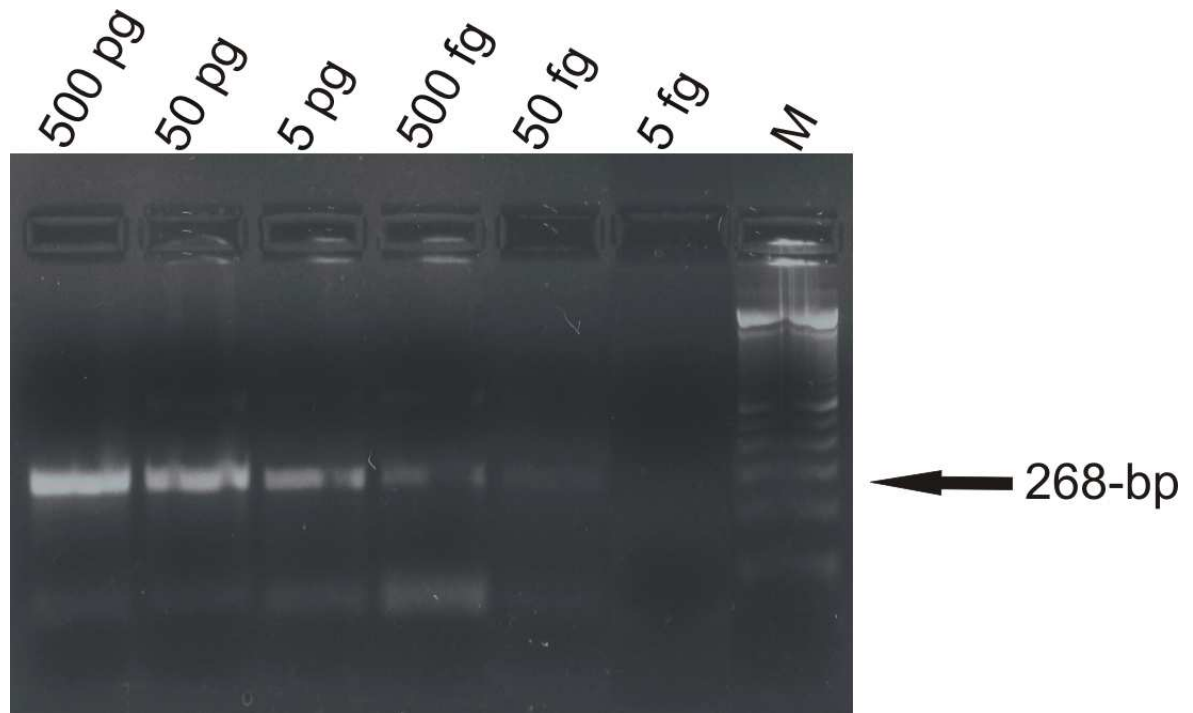


Figure 2. PCR analytical sensitivity, showing 268-bp fragment of human β -globin gene region. M, 100-bp molecular marker (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil).

Table 1. PCR-L and PCR-B results for 106 patients with CL, according to conventional test results.

Indexes	PCR-L		PCR-B	
	Pos	Neg	Pos	Neg
DS	59/59	0/59	21/32	11/32
	Pos (n=60)	100.00; 95.05-100.00	65.63; 48.12-80.42	34.38; 19.58-51.88
	18/33	15/33	2/15	13/15
	Neg (n=33)	54.55; 37.53-70.79	13.33; 2.30-37.52	86.67; 62.48-97.70
IIF	68/79	11/79	28/55	27/55
	Pos (n=90)	86.08; 77.09-92.45	50.91; 37.82-63.90	49.09; 36.10-62.18
	9/13	4/13	3/5	2/5
	Neg (n=15)	69.23; 41.30-89.37	60.00; 18.24-92.65	40.00; 7.35-81.76
MST	65/69	4/69	21/33	12/33
	Pos (n=74)	94.20; 86.61-98.13	63.64; 46.38-78.59	36.36; 21.41-53.62
	0/3	3/3	0/2	2/2
	Neg (n=3)	0.00; 0.00-63.16	0.00; 0.00-77.64	100.00; 22.36-100.00

DS: Direct parasite search, IIF: Indirect Immunofluorescence, MST: Montenegro skin test, PCR-L: Polymerase Chain Reaction in lesion, PCR-B: Polymerase Chain Reaction in blood, Pos: Positive, Neg: Negative.

The proportions were analyzed using Mid-p exact test OpenEpi version 2.3, with confidence interval of 95%. The values are described in done number / total number, and %; 95% CI.

Table 2. Comparison of PCR-L, PCR-B, DS, IIF and MST in relation to time of evolution of lesions in patients with CL.

Evolution time	PCR-L	PCR-B	DS	IIF	MST
< 3 months	40/47	10/22	33/47	38/46	36/38
(n=47)	85.11; 72.75-93.25	45.45; 25.88-66.16	70.21; 56.07-81.94	82.61; 69.64-91.58	94.74; 83.68-99.11
3 - 12 months	29/33	13/21	26/34	32/36	28/28
(n=36)	87.88; 73.30-96.03	61.90; 4.23-80.49	76.47; 60.16-88.43	88.89; 75.34-96.37	100.00; 89.85-100.00
> 12 months	6/8	2/6	1/8	8/9	5/6
(n=9)	75.00; 38.83-95.57	33.33; 6.02-73.81	12.50; 0.63-48.03	88.89; 56.14-99.44	83.33; 40.91-99.17

DS: Direct parasite search, IIF: Indirect Immunofluorescence, MST: Montenegro skin test, PCR-L: Polymerase Chain Reaction in lesion, PCR-B: Polymerase Chain Reaction in blood, Pos: Positive, Neg: Negative.

The proportions were analyzed using Mid-p exact test OpenEpi version 2.3, with confidence interval of 95%. The values are described in done number / total number, and %; 95% CI.

Table 3. Performances of PCR-L, PCR-B, IIF and MST for laboratory diagnosis of CL.

DS	PCR-L		PCR-B		IIF		MST	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	59	0	21	11	53	6	52	0
Neg	23	111	4	53	26	110	16	87
S	59/59		21/32		53/59		52/52	
	100.00; 95.05-100.00		65.63; 48.12-80.42		89.83; 80.05-95.77		100.00; 94.40-100.00	
Sp	111/134		53/57		110/136		87/103	
	82.84; 75.74-88.52		92.98; 83.94-97.73		80.88; 73.62-86.84		84.47; 76.49-90.52	
PPV	59/82		21/25		53/79		52/68	
	72.95; 61.52-80.86		84.00; 65.78-94.70		67.09; 56.18-76.76		76.47; 65.32-85.40	
NPV	111/111		53/64		110/116		87/87	
	100.00; 97.34-100.00		82.81; 72.10-90.62		94.83; 89.55-97.88		100.00; 96.62-100.00	

S: sensitivity, Sp: specificity, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, DS: Direct parasite search, IIF: Indirect Immunofluorescence, MST: Montenegro skin test, PCR-L: Polymerase Chain Reaction in lesion, PCR-B: Polymerase Chain Reaction in blood, Pos: Positive, Neg: Negative.

The proportions were analyzed using Mid-p exact test OpenEpi version 2.3, with confidence interval of 95%. The values of S, Sp, PPV and NPV were determined for the DS test, and they are described in done number / total number, and %; 95% CI.

**Artigo 4: “LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
ATÍPICAS”**

Leishmaniose Tegumentar e Manifestações Clínicas Atípicas

Herintha Coeto Neitzke-Abreu¹, Mateus Sabaini Venazzi², Regiane Bertin de Lima Scodro³, Paulo Donizeti Zanzarini³, Andréa Claudia Bekner da Silva Fernandes³, Sandra Mara Alessi Aristides³, Thaís Gomes Verzignassi Silveira³, Maria Valdrinez Campana Lonardoni^{3*}

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

²Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

³Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

*E-mail: mvclonardoni@uem.br

APRESENTAÇÃO DO CASO

NM, 61 anos, sexo feminino, com lesões no pescoço, foi encaminhada em julho de 2011 para o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. Ao exame físico foi observada pele pálida e seca, tecido celular subcutâneo diminuído, região do pescoço edemaciado e eritematoso, apresentando lesões nodulares e vesículas pustulosas localizadas profundamente na hipoderme formando placas, com endureção subcutânea e vesículas satélites. De acordo com a paciente, essas vesículas rompiam e apareciam outras aos arredores. Havia também linfadenite e três lesões cutâneas abertas, com crostas e exsudato, com a maior apresentando diâmetro de 1,5 cm (Figura 1A). A paciente relatou o aparecimento, há aproximadamente 7 meses (dezembro de 2010), de lesão única no pescoço, vesiculosa e com intensa formação de líquido e secreção purulenta, com prurido intenso e subsequente edema e rubor. A paciente procurou atendimento médico e foi tratada com antibacteriano tópico e benzilpenicilina benzatina intramuscular.

DISCUSSÃO DO CASO

Leishmaniose Tegumentar (LT)

As leishmanioses são protozoonoses que podem assumir formas com lesões destrutivas e incapacitantes e podem levar a óbito [1]. Apresentam alta incidência e estão presentes em 98 países, onde afetam cerca de 14 milhões de pessoas e 350 milhões vivem sob o risco de contrair a infecção [2]. As diferentes formas clínicas da doença são caracterizadas em função da complexidade biológica do parasito, dos reservatórios, dos vetores, do meio ambiente e da resposta imune dos hospedeiros [3]. No Brasil, os casos de LT são principalmente devido a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cujas lesões cutâneas, se não tratadas, podem resultar na forma mucosa, caracterizada por lesões desfigurantes [4].

Os protozoários de *Leishmania* são transmitidos ao homem pela picada de insetos flebotomíneos (*Lutzomyia*) naturalmente infectados. A paciente, moradora do município de Rio Bom (23° 45'S and 51° 24'W), estado do Paraná, sul do Brasil, informou que o local de infecção foi na localidade rural que trabalha, onde há mata, rio/córrego, animais silvestres e domésticos, condições favoráveis à presença de insetos transmissores de *Leishmania*. Antigamente, a presença de flebotomíneos era descrita em áreas de desmatamento, porém atualmente tem sido descrita em ambientes antrópicos de zonas rurais e urbanas [5,6,7]. O município de Rio Bom pertence ao Circuito Paraná-Paranapanema de LT [8].

Manifestações Clínicas

Após a picada do flebotômico surge uma lesão cutânea localizada que se desenvolve a partir de uma pápula inflamatória geralmente levando a uma úlcera. A paciente relatou o aparecimento de lesão primária, porém não ulcerou e apresentava intenso acúmulo de líquido. A lesão cutânea apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas formas: formato arredondado ou ovalado; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras [4]. A paciente apresentava lesões nodulares e vesículas pustulosas localizadas profundamente na hipoderme formando placas, com endurecimento subcutânea e vesículas satélites. Este quadro clínico, associado ao fato de que as vesículas se rompiam levando ao aparecimento de novas lesões fechadas, não é típico de LT.

Diagnóstico

O diagnóstico da LT envolve aspectos clínicos e laboratoriais [1]. O exame clínico se fundamenta nos dados epidemiológicos e nas características da lesão, mas os exames laboratoriais são essenciais para o diagnóstico. Os exames laboratoriais compreendem técnicas de detecção do parasito e técnicas imunológicas [9], possibilitando à identificação das espécies de *Leishmania* e fornecendo informações importantes para o prognóstico da LT e a escolha da terapia apropriada [10,11,12]. Diversas metodologias devem ser utilizadas, porém o diagnóstico da LT pode ser demorado e dificultoso, especialmente nas infecções atípicas pois existem muitas doenças com quadros clínicos semelhantes [4].

Para o diagnóstico de LT foram realizados seis testes laboratoriais. A pesquisa direta (PD) foi realizada em material obtido por escarificação da borda da lesão, corado por Giemsa e analisado por microscopia óptica comum (aumento 1000x) [13], a qual revelou a presença de formas amastigotas característica de *Leishmania* spp. (Figura 2A). A PD é o método padrão para o diagnóstico da LT, embora não informa a espécie de *Leishmania* infectante e apresente baixa sensibilidade em lesões antigas [1]. Neste caso vale notar que havia grande quantidade de amastigotas característica de *Leishmania* spp., mesmo após 7 meses de infecção.

A pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no soro da paciente pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) [14] foi positiva, atingindo títulos de 160.

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) em leucócitos do sangue periférico [12] e em escarificação de lesão com a utilização de iniciadores que amplificam um

fragmento de 70-pb do minicírculo do kDNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* [13]. Os resultados foram positivos (Figura 2B).

O material obtido por escarificação da lesão também foi cultivado em meio Blood Base Agar (BBA) suplementado com antibióticos, porém após 7 dias de cultivo a 25°C houve o crescimento de bactérias contaminantes, o que inviabilizou o crescimento dos protozoários. Método de isolamento em cultura é geralmente limitado, pois a eficácia varia conforme a espécie de *Leishmania* e há grande risco de contaminação bacteriana dos meios de cultura [15].

Foi realizada a intradermoreação de Montenegro (IDRM) através da inoculação intradérmica de 0,1 mL do antígeno (extrato bruto de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* dissolvido em 0.005 g/mL de solução de fenol contendo 40 µg/mL de nitrogênio proteico, fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Estado de Saúde, Paraná, Brazil) na região do antebraço da paciente e a leitura foi realizada após 48 horas [13] mostrando um resultado positivo, com área de endurecimento de 8,0 mm de diâmetro (Figura 2C).

Para pesquisa de fungos, material dos nódulos foi obtido por punção e realizado a microscopia direta em lâmina com KOH e Azul de Evans onde não foram observadas estruturas sugestivas de fungos. Este material de lesão também foi semeado em meio de cultura Micosel e Sabouraud, mas não houve o crescimento de fungos.

Tratamento e Controle de cura

Terapia sistêmica é indicada para as infecções causadas por espécies do complexo de *L. (V.) braziliensis*, para evitar a forma mucosa [4]. Neste caso, após a confirmação do diagnóstico de LT, a paciente iniciou tratamento com antimoníato de N-metilglutamina (Glucantime®) com aplicação intramuscular diária de 20mg/kg durante 20 dias, finalizando o tratamento em novembro de 2011. A paciente não necessitou de internação, porém ao receber a última dose do Glucantime®, teve desmaio e necessitou atendimento hospitalar devido às reações adversas do medicamento.

Após 13 meses da infecção inicial e dois meses do término do tratamento, em janeiro de 2012, a paciente retornou ao laboratório a fim de realizar novos exames para o controle do tratamento. Foi realizado a IFI e o resultado foi não reagente. Neste momento observou-se remissão das lesões cutâneas, com cicatrização e espessamento cutâneo (Figura 1B). Até março de 2013 a paciente não apresentava nenhuma manifestação de recidiva, atendendo aos critérios de cura preconizados pelo Ministério de Saúde [4].

Pontos de aprendizagem

O caso apresentado é importante para alertar aos médicos dermatologistas quanto a existência de formas atípicas da LT, o que chama a atenção para a gravidade da doença.

É extremamente importante suspeitar de LT em pacientes moradores de áreas endêmicas a fim de iniciar o tratamento rapidamente para evitar formas graves da doença.

As diversas formas de lesão da LT mostram a necessidade de um diagnóstico correto e precoce, assim como a importância da investigação epidemiológica nas áreas de ocorrência de casos, a fim de amenizar este importante problema de saúde pública.

Os pacientes devem ser orientados quanto a importância do tratamento e acompanhamento para o controle da cura, pois em infecções por *L. (V.) braziliensis* podem ocorrer formas mucosas da doença, potencialmente fatais.

REFERÊNCIAS

1. Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 36: 71-80.
2. World Health Organization (2013) Manual de controle de Leishmaniose tegumentar americana. Disponível: <http://goo.gl/PiM9n>. Acessado em 05 de abril de 2013.
3. Bănuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, et al. (2011) Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect 17: 1451-1461.
4. Ministério da Saúde (2007) Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Disponível: <http://goo.gl/mPcbz>. Acessado em 05 de abril de 2013.
5. Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E (2002) Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. An Bras Dermatol 77: 681-692.
6. Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro W, Teodoro U (2006) Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. Rev Saúde Pública 40: 1087-1093.
7. Neitzke-Abreu HC, Santos DR, Silva AM, Reinhold-Castro KR, Silveira TGV, et al. (2012) Alteration in frequency of sand flies in domiciles after changes in the peridomicile area, state of Paraná, Brazil. J Vector Ecol 37: 466-470.

8. Monteiro WM, Neitzke HC, Silveira TGV, Lonardoni MVC, Teodoro U, et al. (2009) Poles of American tegumentary leishmaniasis production in northern Paraná state, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 25: 1083-1092.
9. Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG (1999) Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol* 17: 291-296.
10. Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, et al. (2005) Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 73: 999-1004.
11. Jirkù M, Zemanová E, Al-Jawabreh A, Schönián G, Lukes J (2006) Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55: 75-79.
12. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, et al. (2013) Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE* no prelo.
13. Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC, et al. (2006) Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the dianosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 427-430.
14. Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MVC, et al. (1999) Observations on laboratory diagnosis and cutaneous leishmaniasis epidemiology in the State of Paraná State, South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 413-423.
15. Vexenat AC, Santana JM, Teixeira AR (1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 38: 177-185.



Figura 1. A) Manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar de paciente autóctone do estado do Paraná, após 7 meses da infecção inicial e antes do tratamento. B) Cicatrização das lesões cutâneas após 2 meses do tratamento.

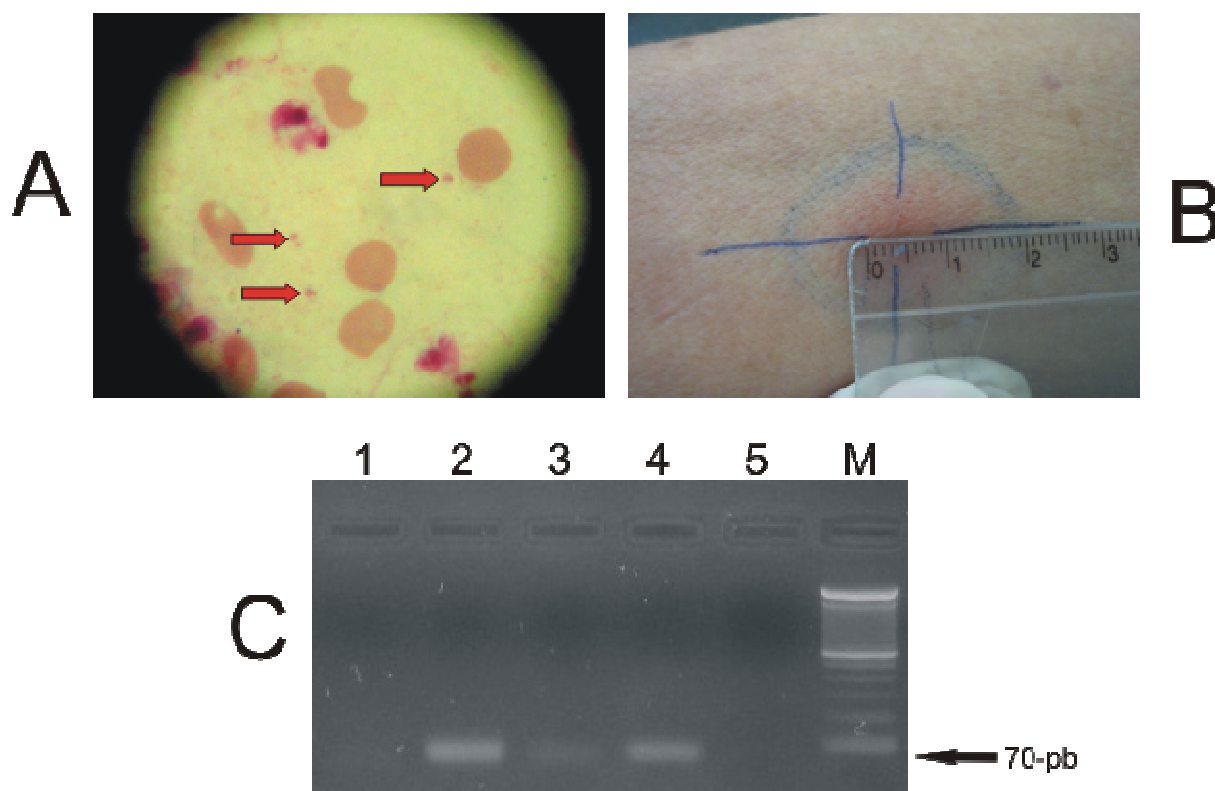


Figura 2. A) Pesquisa direta do parasito em material de escarificação de lesão, apresentando formas amastigotas características de *Leishmania* spp.; coloração de Giemsa analisada por microscopia óptica (aumento de 1000x). B) Gel de agarose mostrando o fragmento de 70-pb do kDNA de *Leishmania* (*Viannia*). Raia 1, controle negativo (água); raia 2, controle positivo [DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*]; raia 3, amostra de leucócitos do sangue periférico; raia 4, amostra de escarificação de lesão; raia 5, controle negativo de extração (sangue de paciente sem LT); M, marcador molecular de 100-pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). C) Teste de intradermorreação de Montenegro (inoculação de 0,1 mL do antígeno) mostrando área de endurecimento de 8,0 mm de diâmetro.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que:

- 1) É importante manter o ambiente peridomiciliar limpo, para evitar o acúmulo de matéria orgânica (folhas caídas, galhos e frutas em decomposição no solo, animais domésticos, fezes e resíduos agrícolas) e umidade do solo, a fim de não permitir a formação de criadouros de flebotomíneos.
- 2) *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* são suscetíveis à infecção por *Leishmania* e a multiplex-PCR, pela sua sensibilidade, especificidade e exequibilidade, pode ser utilizada em estudos epidemiológicos para verificar a infecção natural de flebotomíneos.
- 3) A PCR-L é uma alternativa para o diagnóstico de LT, principalmente em pacientes com lesões crônicas ou que receberam tratamento específico, ou em pacientes com reinfeção ou recidivas de infecção por *L. (V.) braziliensis*, que pode evoluir para lesão mucosa.
- 4) A PCR-S, utilizando DNA extraído de concentrado de leucócitos, pode ser utilizada em pacientes com suspeita de LT, mas que apresentam resultado negativo nos testes convencionais ou em pacientes que não apresentam lesão.
- 6) A PCR é uma boa ferramenta para o diagnóstico e epidemiologia da LT, com a perspectiva de fornecer informações sobre a espécie infectante.
- 7) O diagnóstico correto e precoce da LT, o conhecimento de manifestações atípicas da doença, assim como estudos epidemiológicos nas áreas de ocorrência de casos, são fundamentais para amenizar este importante problema de saúde pública.
- 8) Formas atípicas de LT podem ocorrer, dificultando o diagnóstico clínico, o que reforça a necessidade de métodos de diagnóstico laboratorial mais sensíveis, específicos e que permitam obter informações sobre a espécie de *Leishmania* infectante.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos do impacto das mudanças ambientais na população dos flebotomíneos, bem como o conhecimento dos aspectos comportamentais, da competência vetorial e das taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, auxiliam na epidemiologia das leishmanioses. Além disso, medidas legais para controle de insetos vetores, como medidas de saneamento ambiental devem ser estimuladas. Os resultados encontrados mostram a adaptação dos flebotomíneos aos ambientes antrópicos e devem direcionar futuras medidas de controle, estimar o real risco de transmissão de LT em áreas endêmicas e estimular estudos para melhor conhecimento da biologia dos flebotomíneos.

As técnicas moleculares têm sido amplamente exploradas. Os resultados encontrados mostram o bom desempenho da PCR e devem direcionar os futuros estudos epidemiológicos e de diagnóstico. A padronização da PCR para pesquisa de *Leishmania* permitirá o diagnóstico mais rápido e correto a fim de evitar a forma mucosa potencialmente fatal, Também auxiliará no prognóstico da doença, no controle de cura e acompanhamento dos pacientes, bem como para a escolha da terapia apropriada.