



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Biológicas CCB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP

Infecção natural por *Leishmania* sp. em flebotomíneos capturados no foco de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Piçarras, litoral norte do Estado de Santa Catarina e identificação específica do parasito em amostras clínicas e em cepas isoladas de pacientes.

IZE DE AGUIAR BITTENCOURT

Florianópolis, novembro 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Biológicas CCB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP

**Infecção natural por *Leishmania* sp. em flebotomíneos capturados
no foco de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana
no município de Piçarras, litoral norte do Estado de Santa Catarina
e identificação específica do parasito em amostras clínicas e em
cepas isoladas de pacientes**

Trabalho apresentado como requisito para o cumprimento da disciplina Estágio II (BIO 5156) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Acadêmica: Ize de Aguiar Bittencourt

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Co-orientadora: Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis, novembro 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Steindel, pela oportunidade no laboratório, orientação e por propiciar todas as condições necessárias para o desenvolvimento do meu trabalho e aprendizado ao longo da minha vida acadêmica. Não posso deixar de agradecer pela galinhada, feijoada.... humm... que tornaram possíveis muitas confraternizações do laboratório!

A minha co-orientadora Patrícia Hermes Stoco, pela paciência, disponibilidade e incentivo, além do principal, a amizade. Os vários dias em que a solução foi tomar UMA cerveja depois dos experimentos, foram reconfortantes e as conversas foram inesquecíveis. Sem falar das festas que sempre agitamos com toda a turma do laboratório. Alíás, faz tempo que estamos combinando um shushi no salão de festas da Thais! A empolgação, o esforço e dedicação com que ela desenvolve todas as atividades a que se propõe, fazem dela um exemplo a ser seguido. Amiga, OBRIGADA!

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, pelos ensinamentos, incentivo e “puxões” de orelha, todos sempre feitos em horas muito adequadas, fato que o tornam muito justo e querido.

Ao Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto, pelo constante bom humor e bom senso, que me mostraram, mesmo que sem querer, possibilidades diferentes das que sempre me foram apresentadas.

Ao Prof. Dr. Carlos Brisola Marcondes, pela captura dos flebotomíneos e fornecimento de alguns dados para o desenvolvimento do meu trabalho.

As colegas que já não estavam mais no laboratório: Lê, Dani ruiva e Milene que foram as minhas primeiras “orientadoras” logo que cheguei. Até hoje me lembro

da primeira frase que a Dani falou: “ Nós somos as mais legais do laboratório”.
Alguém duvida??

A Dani morena, pela amizade, companheirismo e compreensão, é sem dúvida uma pessoa especial para quem sempre irei torcer. Que consigas atingir todos os teus objetivos. E olha que são muitos! Não posso esquecer de agradecer pelas figuras da minha apresentação, e as fotos lindas dos amastigotas!

Aos meus amigos da Proto 1 e 2: Lari, Elisa Orlandi, Elisa Prestes, Carol, Alexandre, Yuri, Rebeca, Cacá, Débora, Rafa, Mari, Ethel, Cris, Maísa, Jú e Beto pela convivência agradável, pelas várias festinhas e os bafões!

Aos estudantes do LIA e LVA, pela troca de conhecimento e materiais.

As doutorandas Ane e Thais, pelo conhecimento compartilhado, conversas agradáveis e momentos de alegria em que passamos juntas com todos do laboratório.

As meninas do MUFFHS, pela amizade desde o início do curso, e pelos vários “finais de semestre”, que serão inesquecíveis.

Aos FRACTAIS, turma que eu ADORO, agradeço por estarmos nos formando juntos. A galera mais empolgada da Bio. A nossa formatura vai ser demais!

Aos amigos que não conheci nesta Universidade, mas que me proporcionaram ótimos 4 anos de graduação: Felipe, Jean, Alexandre, Michele, Dani, Xima, Alonso, todo o pessoal da Turma da Manguaça, a galera da Barra, da Matemática, da Banda Newaska e ao Piazza, que além de tudo, me deu um namorado!

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo acompanhamento, incentivo e “apoio logístico” para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida. Muito obriga pela confiança que me fizeram sentir cada vez mais capaz e determinada. Amo vocês!

Ao meu namorado João Henrique, pela paciência, companheirismo, carinho, compreensão e pelos muitos momentos agradáveis que me confortaram e incentivaram a continuar. Esse sofreu!

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos.

Ao CNPQ e a UFSC pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para minha formação, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem cerca de 12 milhões de indivíduos em 88 países em todo o mundo. A transmissão do parasito ao homem, assim como para outros mamíferos, ocorre através da picada de insetos fêmeas pertencentes a subfamília Phlebotominae. Devido ao surgimento de novos casos dessa parasitose no norte do Estado de Santa Catarina, um amplo estudo clínico e epidemiológico vem sendo desenvolvido no intuito de minimizar e até eliminar a transmissão do parasito. Assim, o presente estudo objetivou detectar a presença de *Leishmania* spp. em flebotomíneos capturados na cidade de Piçarras e caracterizar as amostras de *Leishmania* isoladas de pacientes provenientes dos focos de LTA no litoral norte do Estado. Para tanto, foram capturados nos meses de março, nos anos de 2006 e 2007, em armadilhas luminosas tipo CDC, cerca de 3.000 exemplares de flebotomíneos na cidade de Piçarras, norte do estado de Santa Catarina, pertencentes as espécies *Nyssomyia neivai*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia fisheri*, sendo 98% de *Ny. neivai*. Para pesquisa da infecção natural, 886 fêmeas de *Ny. neivai* e 23 fêmeas de *Lu. migonei* foram divididas em 107 pools (102 de *Ny. neivai* e 5 de *Lu. migonei*) de aproximadamente 10 indivíduos e submetidos a extração de DNA segundo Collins e colaboradores, 1987. Os iniciadores PhS1 e PhS2 e 150 e 152 foram utilizados para amplificação de DNA de Phlebotominae e o kDNA de *Leishmania* sp., respectivamente. Todos os 107 pools examinados apresentaram a banda de 220pb específica de Phlebotominae e 11 (9,8%) apresentaram também a banda de 120pb específica de *Leishmania* sp. A identificação específica dos produtos de PCR foi feita através de *Southern Blot* usando sondas para *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis*, conjugadas com peroxidase através do Kit ECL, confirmando a presença de *Le. braziliensis* nos 11 pools positivos. Para a determinação específica de *Leishmania* sp. presente nas amostras de pacientes, foi utilizada a técnica da PCR-RFLP. DNA dos pacientes foram amplificados utilizando-se iniciadores 150 e 152 e foram submetidos a digestão com a enzima *HaeIII* e *AvaI*, separadamente. Foram testados 124 pacientes, um apresentou padrão de bandas compatível com a espécie *Le. amazonensis*, os outros 123 apresentaram padrão de restrição igual ao de *Le. braziliensis*. Estes resultados mostram pela primeira vez a infecção natural de *Ny. neivai* por *Le. braziliensis* no Brasil e sugerem a presença de dois ciclos de transmissão da parasitose no estado, devido a confirmação da existência de *Le. amazonensis* nos pacientes.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O inseto vetor da Leishmaniose pertencente a Ordem Diptera e Sub Família Phlebotominae (fonte: www.usp.br/agen/capa/imgs2003/146.jpg)..... 1

Figura 2: Diversidade de manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). (A) Lesão cutânea típica; (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa.
Fontes:

A - www.ribeiraopreto.sp.gov.br/SSAUDE/doencas/Imagens/ulcera-Bauru3.jpg

B - www.biomedcentral.com/content/figures/1471-2334-6-139-4-l.jpg

C - www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html 2

Figura 3: Distribuição das principais espécies de *Leishmania* na transmissão da LTA (Fonte: Ministério da Saúde -2005)..... 3

Figura 4: A - Microfotografia da forma promastigota de *Leishmania* spp. em cultura (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x). **B** – Micrografia da forma amastigota intracelular coradas com Giemsa (aumento de 1.000x). Fontes:

A - <http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/Imagens/promastigote.jpg>

B - <http://www.santohuberto.com/conteudos/img164d.jpg> 5

Figura 5: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. no hospedeiro invertebrado e mamífero (Fonte: Center Diseases Control – CDC). 1- fêmea de flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo sobre a pele lesionada, 2 – Promastigotas são fagocitados por macrófago, 3 – Dentro dos macrófagos, no interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigota, 4 - amastigotas podem ser liberados e são capazes de infectar novos macrófagos, disseminando o parasito, 5 - flebotomíneo se infecta ao exercer sua hematofagia em um mamífero infectado, 6 - Juntamente com o sangue ocorre a ingestão de formas amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo, 7 - As formas intracelulares são liberadas no trato digestivo do inseto, onde diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas, 8 – A forma promastigota multiplicando-se por divisão binária e irão migrar para a probóscide do vetor. 6

- Figura 6-** Casos de LTA diagnosticados no Laboratório de Protozoologia da UFSC de 1999 a 2008 em relação a autoctonia. Fonte: Laboratório de Protozoologia.9
- Figura 7:** Mapa mostrando os sitios de captura dos flebotomíneos (1-4) na cidade de Piçarras, Estado de Santa Catarina , Brasil e a Rodovia BR-101. 12
- Figura 8** – Gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo, revelando os produtos de amplificação via PCR do teste de sensibilidade com DNA de 10 flebotomos e quantidades diferentes de *L. braziliensis*. **PM** – padrão de peso molecular (pUC 18 digerido com a enzima *HaeIII*); **1**- 2.000 parasitos; **2** – 200 parasitos; **3** – 20 parasitos; **4** – 2 parasitos; **5** – Controle negativo (Água); **6** – Controle positivo - DNA de Flebotomíneo; **7** – Controle positivo - DNA de *Leishmania braziliensis*..... 19
- Figura 9** – Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pela prata, revelando a amplificação do DNA de *Leishmania* sp., em amostras de flebotomíneos capturados nos focos de transmissão. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC18 digerido com a enzima *Hae III*); **1** – Controle positivo - DNA de flebotomíneo; **2** – Controle positivo - DNA de *Leishmania braziliensis*; **3 a 5** – Amostras (*pools*) positivas; **6** – Amostra negativa; **7** – Controle negativo (Água). 20
- Figura 10** – **A** – Gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídeo dos produtos de amplificação resultantes dos “*pools*” de flebotomíneos para pesquisa de *Leishmania* sp. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC 18 digerido com a enzima *HaeIII*). **1 a 9** – amostras de campo, **10** – Controle positivo - DNA *L. amazonensis*, **11** – Controle positivo - DNA Flebotomíneo + DNA *L. braziliensis*, **12** – Controle positivo - DNA *L. braziliensis*, **13** – Controle negativo (Água), **14** – Controle positivo-DNA de Flebotomíneo, **B** – Membrana hibridizada com sonda específica de *L. braziliensis*, **C** – Membrana hibridizada com sonda específica de *L. amazonensis*. 21
- Figura 11** – Gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etideo, representativo dos produtos de PCR obtidos a partir de amostras clínicas digeridos com a enzima *AvaI*. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC 18 digerido com a enzima *HaeIII*), **1 a 4** - amostras de pacientes, **5** – Controle positivo - *L. amazonensis*, **6** – Controle positivo – *L. braziliensis*. 22

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etideo, representativo dos produtos de PCR obtidos a partir de amostras clínicas digeridos com a enzima *HaeIII*. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC 18 digerido com a enzima *HaeIII*), **1 a 6** - amostras de pacientes, **7** – Controle positivo - *L. braziliensis*, **6** – Controle positivo – *L. amazonensis*.....23

Figura 13 - Mapa do município de Piçarras apresentando áreas demarcadas em cor laranja onde houve maior prevalência de estudantes reatores ao teste intradérmico de Montenegro (segundo SIMON & FERNANDES, 2006)..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS

Aval – Enzima de restrição proveniente do organismo *Anabaena variabilis*
DMSO - DIMETIL SULFOXIDO
DNA - Ácido Desoxiribonucleico
dNTP - Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético
g - Força da gravidade
HaeIII - Enzima de restrição proveniente do organismo *Haemophilus influenzae*
Kb - Quilobase
kDNA - DNA do cinetoplasto
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
LV - Leishmaniose Visceral
M – Molar
Mb - Megabase
ml - Mililitro
mM - Milimolar
NaCl - Cloreto de Sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
ng - Nanograma
nm - Nanometro
pb - Pares de bases
PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PCR - RFLP - do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*
pH - Potencial hidrogeniônico
pmoles - Picomoles
RNAse - Ribonuclease
SBF - Soro Bovino Fetal
SC - Estado de Santa Catarina
SDS - Dodecil sulfato de sódio
Taq - *Thermus aquaticus*
Tris-HCl - Tampão Tris-HCl
U - Unidade
UV - Ultra violeta
 μm - Micrometro

μg - Micrograma

μl - Microlitro

$\mu\text{J}/\text{cm}^2$ - Microjaulas / centímetro quadrado

% - Porcentagem

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 As Leishmanioses.....	1
1.2 O Parasito	4
1.3 Diagnóstico.....	7
1.4 Situação em Santa Catarina	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Cultivo de <i>Leishmania</i> sp. utilizada como controle	11
3.2 Captura de Flebotomíneos.....	11
3.3 Extração de DNA de Flebotomíneos.....	12
3.4 Limite de sensibilidade da PCR multiplex.....	13
3.5 Pesquisa da infecção natural em flebotomíneos por <i>Leishmania</i> sp.....	14
3.6 Ensaios de hibridização.....	15
3.7 Isolamento de <i>Leishmania</i> sp. a partir de amostras clínicas	16
3.8 Extração de DNA de amostras de <i>Leishmania</i> sp., provenientes de cultura e biópsia.....	16
3.9 PCR-RFLP	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Determinação do limite de sensibilidade da PCR multiplex.....	18
4.2 Aplicação da técnica da PCR para detecção de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de campo.....	18
4.3 <i>Southern Blot</i>.....	20

4.4 PCR – RFLP	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8. ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acometem cerca de 12 milhões de indivíduos em 88 países de todo o mundo, sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão (MURRAY *et al.*, 2005). A transmissão do parasito ao homem, assim como para outros mamíferos ocorre através da picada de fêmeas pertencentes a Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae (Figura 1).



Figura 1: O inseto vetor da Leishmaniose pertencente a Ordem Diptera e Subfamília Phlebotominae (fonte: www.usp.br/agen/capa/imgs2003/146.jpg)

A doença humana apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas com diferenças marcantes na gravidade e impacto na saúde. A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é a forma mais grave das leishmanioses (MURRAY *et al.*, 2005), sendo uma disseminação crônica da infecção para o fígado, baço e medula óssea, que pode ser fatal se o paciente não for submetido a tratamento específico (LINN, *et al.*, 2008). No Brasil, existem registros de calazar endêmico na região norte, nordeste, sudeste e centro oeste. Na região, não há registros de casos autóctones de LV (GENARO, 2003). No Brasil a

Leishmaniose Visceral tem como agente etiológico a *Le. chagasi* (GENARO, 2003) e é transmitida pelo vetor da espécie *Lu. longipalpis* (WILLIAN, 2003).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico, considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas (HEPBURN, 2000), sendo que diferentes espécies de *Leishmania* estão intimamente associadas com as variadas manifestações clínicas da doença (LEIFSO *et al.*, 2007).

Na leishmaniose cutânea a lesão inicia-se por uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente ulcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico, granuloso e úmido (Figura 2A).

A leishmaniose mucosa (Figura 2B), manifestação mais severa da LTA, pode ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Esta manifestação da doença pode ocorrer em 1 a 10% dos casos de infecção por *L. braziliensis*, mesmo após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas (MURRAY *et al.*, 2005). Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias (HEPBURN, 2000).

A forma difusa da doença (Figura 2C) é rara e ocorre em pacientes infectados pela *L. amazonensis* (MURRAY *et al.*, 2005).

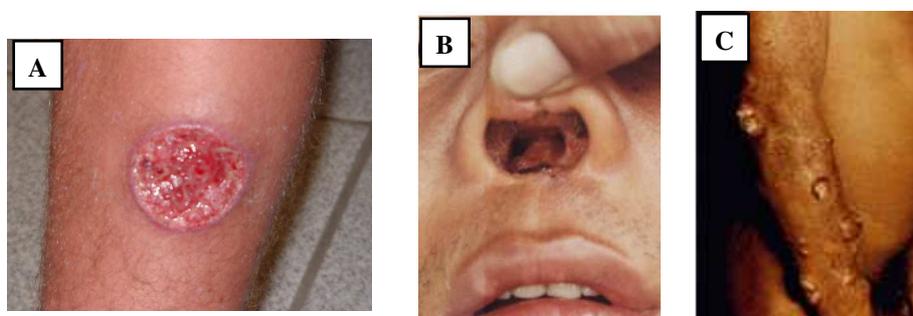


Figura 2: Diversidade de manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). (A) Lesão cutânea típica; (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa. Fontes:
A - foto original - Laboratório de Protozoologia
B - www.biomedcentral.com/content/figures/1471-2334-6-139-4-l.jpg
C - www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html

No Brasil as leishmanioses ocorrem de forma endêmica em todas as regiões devido ao grande número de espécies relacionadas e a sua ampla distribuição (Figura 3). A contínua invasão da mata para atividades de agricultura, caça de animais, exploração de minerais ou abertura de estradas faz com que o homem acabe inserido no ciclo silvestre da doença. Atualmente, um novo cenário epidemiológico está se estabelecendo, no qual a doença vem se disseminando também em áreas urbanas, principalmente devido a destruição constante dos habitats naturais dos vetores e reservatórios (COSTA, *et al.*, 2007). Estima-se que ocorram a cada ano entre 35-50 mil novos casos da doença no Brasil (GONTIJO *et al.*, 2003) e 1,5 milhões novos casos em todo o mundo (WHO, 2008).

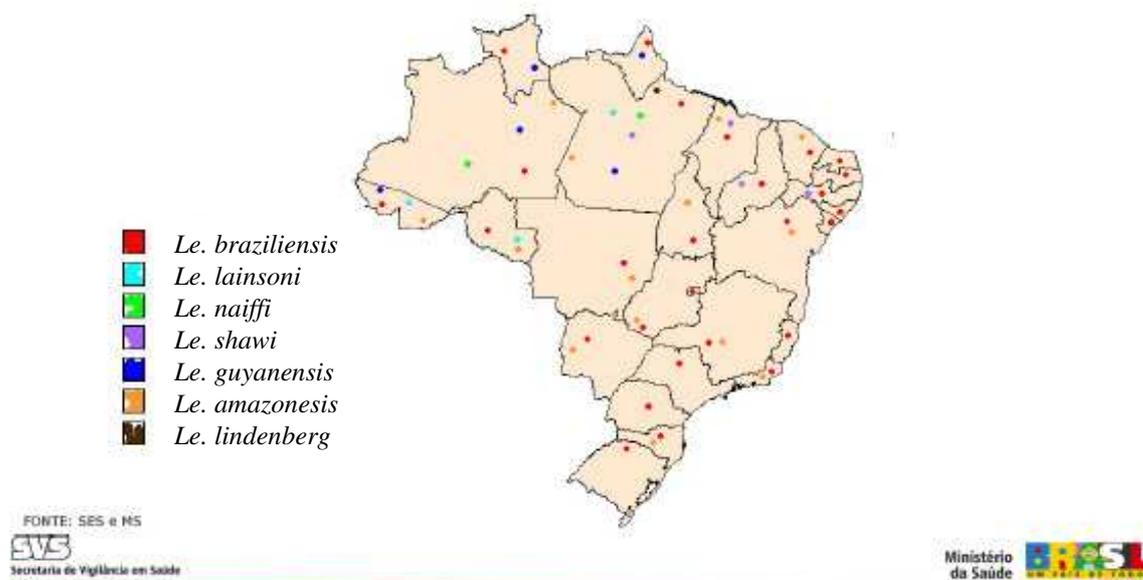


Figura 3: Distribuição das principais espécies de Leishmania na transmissão da LTA (Fonte: Ministério da Saúde -2005).

Estudos realizados em diferentes regiões do país apontam que a forma cutânea das leishmanioses é causada por 10 diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo *Le. braziliensis* o agente etiológico mais freqüente associado a um grande número de espécies de flebotomíneos (SILVEIRA *et al.*, 2004), resultando em ciclos de transmissão com características ecoepidemiológicas distintas nas diferentes regiões geográficas (COSTA *et al.*, 2007).

Dentre as espécies de flebotomíneos conhecidas (~500), 30 têm sido encontradas naturalmente infectadas pelo parasito, podendo ser consideradas como potenciais vetores da doença (WHO, 2008).

No Brasil as principais espécies envolvidas são *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. flaviscutellata*, entre outras. Algumas dessas espécies possuem relação estreita com espécies de *Leishmania*, sendo portanto vetores específicos de algumas das formas clínicas das leishmanioses (GENARO, 2003). Flebotomíneos do complexo *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* [*Ny. intermedia* (LUTZ; NEIVA, 1912) e *Ny. neivai* (PINTO, 1926)] (ANDRADE FILHO *et al.* 2004) estão amplamente distribuídos na América do Sul e muito bem adaptados a ambientes alterados (GOMES *et al.*, 1982). A espécie *Lu. intermedia* encontra-se nos estados mais quentes do Brasil, enquanto que *Ny. neivai* tem sua presença associada a localidades mais frias, de Minas Gerais ao sul do Brasil (MARCONDES *et al.*, 1997; ANDRADE FILHO *et al.* 2004).

No estado de Santa Catarina a fauna de flebotomíneos é ainda pouco conhecida, apesar de já terem sido identificadas doze espécies. No oeste do estado alguns estudos têm sido desenvolvidos a fim de identificar as espécies dos vetores presentes, porém na região costeira onde foram identificados novos focos de *Leishmaniose*, pouco se conhece a respeito desses insetos. Estudos preliminares realizados por Marcondes e colaboradores (2005) no município de Piçarras-SC, apontam a predominância de *Ny. neivai* sugerindo essa espécie como possível vetor da Leishmaniose no estado de SC.

1.2 O Parasito

O gênero *Leishmania* compreende protozoários digenéticos da ordem kinetoplastida, família Trypanosomatidae (SHAW, 1994). Este parasito de ciclo heteroxênico e muito complexo, apresenta formas promastigotas flageladas

extracelulares e formas amastigotas intracelulares obrigatórias, sendo estas últimas responsáveis por todas manifestações clínicas da doença (GENARO, 2003; CHENICK, *et al.*, 2006).

No hospedeiro vertebrado a *Leishmania* sp. se apresenta na forma de amastigota esférica, imóvel e de tamanho aproximado de 2,5 μm que se prolifera dentro do fagolisossomo do macrófago hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002) (Figura 4B). Nos flebotomíneos, os parasitos vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sangüíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas (GONTIJO *et al.*, 2003) (Figura 4A).

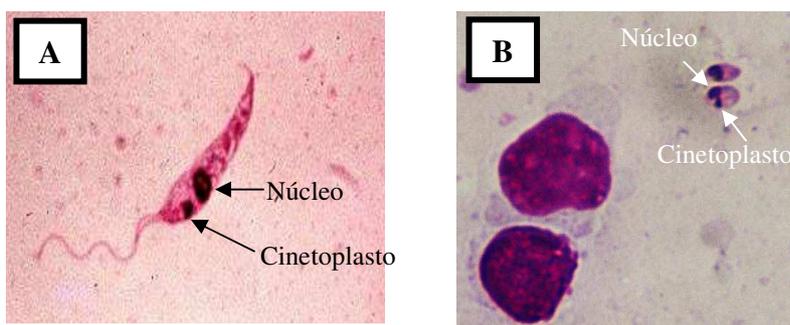


Figura 4: **A** - Microfotografia da forma promastigota de *Leishmania* spp. em cultura (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x). **B** – Microfotografia da forma amastigota intracelular coradas com Giemsa (aumento de 1.000x). Fontes:

A - <http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/Images/promastigote.jpg>

B - foto original – Laboratório de Protozoologia

A infecção por *Leishmania* sp. no hospedeiro mamífero ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sangüíneo sobre a pele lesionada. Estas formas são fagocitadas por macrófagos e, no interior do vacúolo parasitóforo, se diferenciam em formas amastigotas que ali se multiplicam. Estes amastigotas podem ser liberados e são capazes de infectar novos macrófagos, disseminando o parasito. O flebotomíneo se

infecta ao exercer sua hematofagia em um reservatório mamífero infectado. Juntamente com o sangue ocorre a ingestão de formas amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo. As formas intracelulares são liberadas no trato digestivo do inseto, onde diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas, multiplicando-se por divisão binária. Estas formas procíclicas diferenciam-se para formas metacíclicas infectivas e migram para a probóscide do inseto, de onde poderão infectar um novo hospedeiro mamífero (Figura 5).

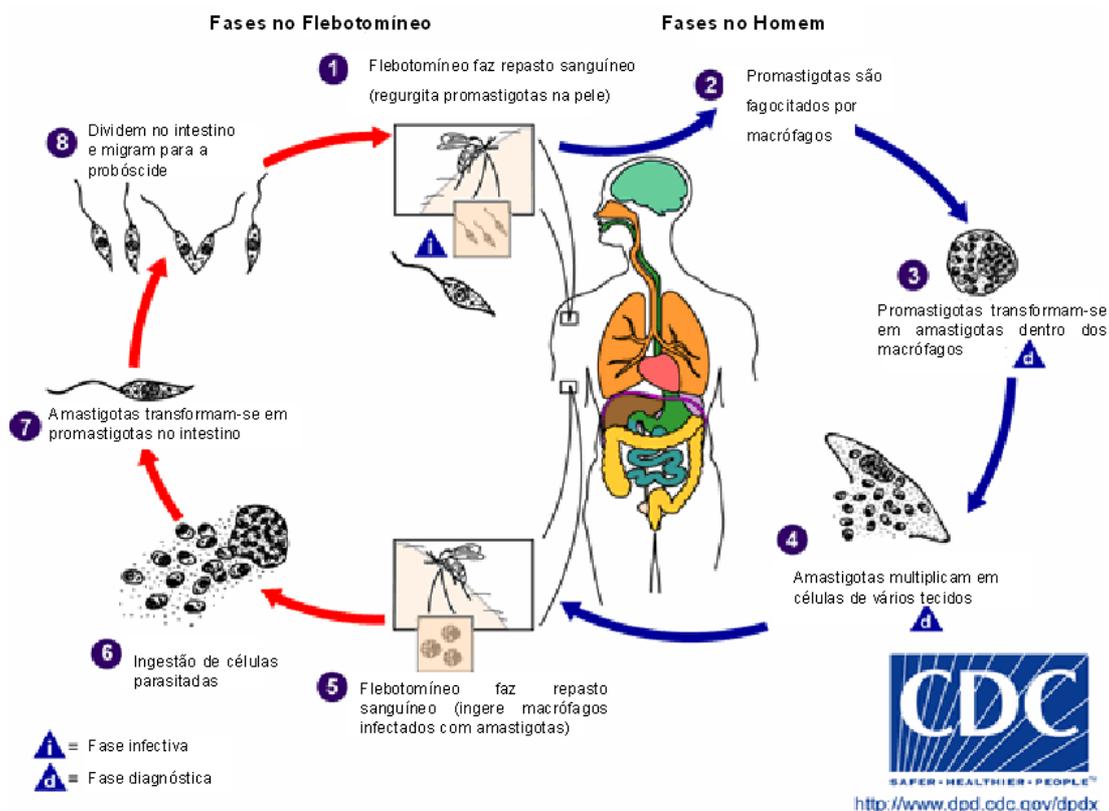


Figura 5: Ciclo biológico da *Leishmania* sp. no hospedeiro invertebrado e mamífero (Fonte: Center Diseases Control – CDC). 1- fêmea de flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo sobre a pele lesionada, 2 – promastigotas são fagocitados por macrófago, 3 – dentro dos macrófagos, no interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigota, 4 - amastigotas podem ser liberados e são capazes de infectar novos macrófagos, disseminando o parasito, 5 - flebotomíneo se infecta ao exercer sua hematofagia em um reservatório mamífero infectado, 6 - juntamente com o sangue ocorre a ingestão de formas amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo, 7 - amastigotas no trato digestivo do inseto se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, 8 – forma promastigota multiplicando-se por divisão binária e irão migrar para a probóscide do vetor. (fonte: CDC – Centro de Controle e Prevenção de doenças – com modificações)

1.3 O Diagnóstico

Inúmeras outras etiologias apresentam quadros clínicos semelhantes ao da Leishmaniose, não permitindo a realização de diagnóstico clínico confiável o que pode ocasionar prejuízos significativos ao paciente (RANASINGHE *et al.*, 2008). O método padrão de diagnóstico laboratorial para leishmaniose baseia-se na pesquisa microscópica do parasito em preparações coradas, confeccionadas a partir de fragmentos de biópsia dos pacientes. Este método embora muito útil na fase inicial da doença é pouco eficaz no diagnóstico das infecções crônicas, ocasionando freqüentemente resultados falso negativos (MACHADO, 2004). Um dos avanços no diagnóstico da leishmaniose foi oriundo da utilização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) principalmente nas infecções crônicas (WEIGLE *et al.*, 2002, MURRAY *et al.*, 2005). Além disso, a amplificação de genes específicos do parasito, seguido da digestão do produto amplificado com endonucleases de restrição, permite a identificação específica da *Leishmania* spp. a partir de amostras clínicas, sem necessidade de isolamento do parasito (VOLPINI *et al.*, 2004). Esta técnica, denominada de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*), permite a diferenciação de espécies de *Leishmania* que podem provocar manifestações distintas da doença e eventualmente requerer diferentes tratamentos (ROTUREAU *et al.*, 2006). Além disso, metodologias deste tipo permitem o acompanhamento clínico dos pacientes que apresentam recidivas após tratamento específico e a identificação da *Leishmania* diretamente nos insetos vetores, sendo ferramentas cruciais para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos e programas de controles (PAIVA *et al.*, 2006).

O estudo das taxas de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* sp. é tradicionalmente feito a partir da visualização em microscopia óptica do tubo

intestinal do inseto dissecado ou isolamento do parasito *in vivo* ou *in vitro*. Estes métodos dispõem muito tempo, possuem baixa sensibilidade e eficácia, diminuindo a precisão dos dados obtidos (RANASINGHE *et al.*, 2008). O desenvolvimento de métodos acurados para a identificação de *Leishmania* sp. nos insetos vetores é importante para estudos epidemiológicos confiáveis e efetivo controle da doença (SILVA *et al.*, 2008). Estudos recentes apontam a PCR como uma metodologia molecular de grande relevância para a pesquisa da infecção de *Leishmania* sp. em reservatórios e flebotomíneos (MIRANDA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2006). A utilização de dois pares de iniciadores permite a identificação de dois alvos de interesse, essa técnica é conhecida como PCR Multiplex e proporciona além da identificação da infecção natural o controle da extração do DNA, utilizando-se iniciadores específicos para genes presente somente nos insetos, além dos iniciadores para detectar DNA de *Leishmania* sp. ([referencia](#))

1.4 Situação em Santa Catarina

Dados relacionados a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em Santa Catarina (SC) datam de 1987, quando foi detectado o primeiro foco de LTA na região oeste do Estado, nos municípios de Quilombo e Coronel Freitas. Na ocasião, foram identificados 11 casos autóctones da doença entre 14 trabalhadores rurais infectados (SÃO THIAGO; GUIDA, 1990). A partir da década de 90, inúmeros casos importados da forma cutânea e mucocutânea da doença foram registrados nas diferentes regiões do Estado (LIMA FILHO; STEINDEL, 1998). A partir de 1997, um novo foco de transmissão da doença foi identificado na região do litoral norte do estado (LIMA *et al.*, 2000). No período de 1993 a 2004, foram registrados 86 casos de LTA em Santa Catarina, dos quais 15 eram autóctones provenientes do município de Piçarras (MACHADO, 2004). Um novo surto da doença vem ocorrendo em vários

municípios (Balneário Camboriú, Itapema, Aurora, Luis Alves, Blumenau e Itajaí) onde foram registrados 58 casos autóctones no ano de 2005 (Figura 6) (EGERMANGRICH *et al.*, 2005), incluindo a primeira ocorrência de LTA autóctone na Ilha de Santa Catarina em 2007. Estes resultados revelam uma ampliação na distribuição geográfica da doença o que implica em impactos relevantes na saúde pública e no turismo.

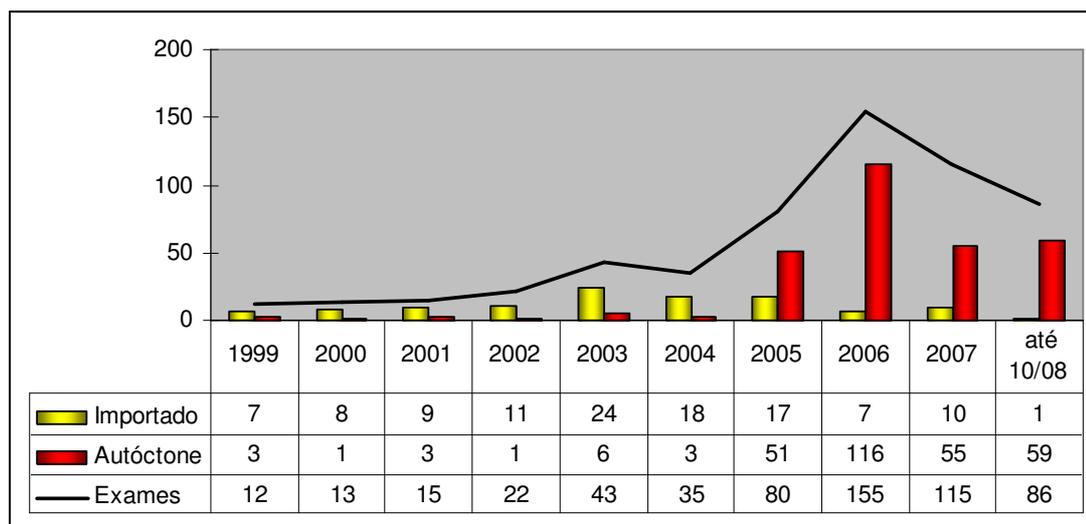


Figura 6- Casos de LTA diagnosticados no Laboratório de Protozoologia da UFSC de 1999 a 2008 em relação a autoctonia. Fonte: Laboratório de Protozoologia.

A caracterização das amostras de *Leishmania* sp. isoladas de pacientes revela a presença de duas espécies (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*) responsáveis pelos casos de LTA em Santa Catarina (GRISARD *et al.*, 2000, MACHADO, 2004).

A expansão dos focos de transmissão existentes e o aparecimento de novos focos da parasitose associados ao crescente número de casos de LTA em Santa Catarina têm grande importância para a saúde pública bem como para a economia da região litoral norte, baseada principalmente no turismo.

Desta forma, a identificação de *Leishmania* sp. em flebotomíneos para o conhecimento da(s) espécie(s) vetor(es) locais da parasitose e a caracterização do parasito a partir de vetores infectados bem como de pacientes portadores possui grande relevância para o entendimento dos aspectos eco-epidemiológicos da parasitose da doença na região.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Pesquisar a infecção natural por *Leishmania* sp. em flebotomíneos capturados no município de Piçarras, realizando a identificação específica destas amostras, bem como de biópsias e cepas isoladas de pacientes provenientes de diferentes municípios do Vale do Itajaí.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Pesquisar a infecção natural por *Leishmania* sp. em flebotomíneos provenientes do município de Piçarras.
- 2) Identificar as espécies de *Leishmania* sp. presentes nos flebotomíneos de campo.
- 3) Isolar as cepas de *Leishmania* sp. oriundas de biópsias e/ou aspirados de lesões dos pacientes.
- 4) Identificar as espécies de *Leishmania* sp. isoladas de pacientes e a partir do DNA das biópsias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Leishmania* sp. utilizada como controle.

As cepas padrões de *Le. braziliensis* (2904) e *Le. amazonensis* (575) utilizadas como padrões foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item 3.2. Estas cepas foram mantidas rotineiramente através de passagens semanais. Para os ensaios de identificação os parasitos obtidos na fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com solução tampão salina 1X (0,8g de Cloreto de Sódio, 0,02g de Cloreto de Potássio, 0,115g de Fosfato de sódio dibásico, 0,02g de Fosfato de Potássio Monobásico, 100ml de água ultrapura) (PBS) e congelados a -20°C até a extração do DNA.

3.2 Captura de Flebotomíneos

Três mil espécimes de flebotomíneos foram capturados em armadilhas luminosas do tipo CDC pela equipe do Professor Carlos Brisola Marcondes, da Universidade Federal de Santa Catarina, no período entre março de 2006 e março de 2007 na cidade de Piçarras, litoral norte do Estado de Santa Catarina, nos bairros: Santo Antônio (Região 1), Centro (Região 2), Nossa Senhora da Conceição (Região 3) Nossa Senhora da Paz (Região 4) (Figura 7).

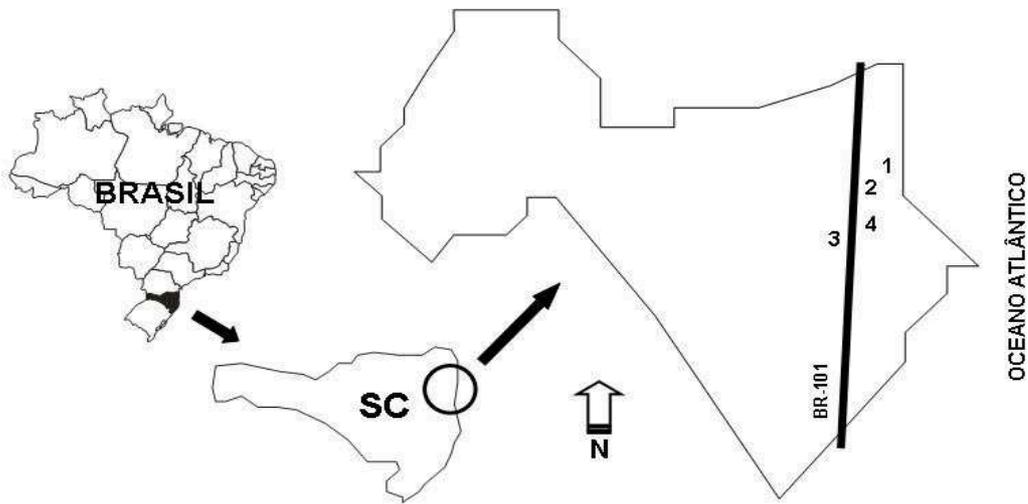


Figura 7: Mapa mostrando os sítios de captura dos flebotomíneos (1-4) na cidade de Piçarras, Estado de Santa Catarina, Brasil e a Rodovia BR-101.

Os flebotomíneos foram agrupados por armadilha e dia de captura, separados quanto ao sexo, dissecados e identificados quanto à espécie através de caracteres morfológicos da genitália pelo Prof. Carlos Brisola Marcondes. A identificação prévia mostrou a presença das espécies que habitavam os locais de coleta: *Ny. neivai*, *Lu. migonei* e *Lu. fisheri*, sendo 98% dos insetos da espécie *Ny. neivai*. Um total de 886 fêmeas de *Ny. neivai* e 23 fêmeas de *Lu. migonei* foram agrupadas em 107 *pools* (102 *pools* de *Ny. neivai* e 5 de *Lu. migonei*) de aproximadamente 10 indivíduos, e acondicionados em álcool 70%, para posterior extração do DNA.

3.3 Extração de DNA de Flebotomíneos

Grupos de 10 flebotomíneos (fêmeas) da mesma espécie, separados por data e local de coleta, foram macerados em tubo eppendorf de 1,5 ml contendo 0,5 ml de tampão de extração (0,08 M NaCl, 0,16 M sacarose, 0,06 M EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6) acrescido de 100 µg/ml de proteinase K e posteriormente mantidos por 2 horas a 65°C para subsequente extração de DNA pelo método descrito por Collins et al. (1987). Posteriormente, foi adicionado acetato de potássio na concentração final de 2M e a mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA ocorreu pela adição de 3 volumes de etanol 100%, permanecendo a -70°C por 30 minutos. Após um novo ciclo de centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos, o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70% e mantido a temperatura ambiente para evaporação do álcool. O DNA foi solubilizado em 30 µl de água ultrapura e tratado com RNase A a 10mg/ml por 1 hora a 37°C. A pureza e a quantificação do DNA foram determinadas através de espectrofotometria a 260/280nm e as amostras foram armazenadas a -20° C até o seu uso. Alguns grupos de 10 insetos machos também foram utilizados para padronização da extração de DNA e determinação da sensibilidade da reação de PCR.

3.4 Limite de sensibilidade da PCR multiplex

Para determinar a sensibilidade da PCR, *pools* de 10 flebotomíneos machos artificialmente infectados com 2.000, 200, 20 e 2 espécimes de *Leishmania* sp. obtidas através da diluição de cultura, foram submetidos à extração de DNA, segundo Collins *et al.* (1987). Após a extração, o DNA foi diluído 10 vezes e submetido à PCR multiplex, conforme descrito no item 3.5. Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 10% corados com brometo de etídio visualizados com o auxílio de um transiluminador Macro Vue UV 20® (Hoefler Pharmacia Biotech, San Francisco) e fotodocumentadas com o auxílio do programa *Doc-ItLS* (UVP).

3.5 Pesquisa da infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* sp.

Para a detecção da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* sp. através da PCR foram utilizados os iniciadores: 150 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT (C/G)CGAA-3' e 152 5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC-3' dirigidos para a região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* sp. gerando um produto de 120 pb (VOLPINI *et al.*, 2004). Adicionalmente, na mesma reação, foram utilizados os iniciadores dirigidos ao gene da cacofonia de Phlebotominae (PhS1 - 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e PhS2 - 5' CCACGAACAAGT TCAACATC 3') que geram um produto de 220 pb (PEIXOTO *et al.*, 2001), caracterizando uma PCR do tipo Multiplex que é uma reação de amplificação utilizada para possibilitar a detecção de múltiplas seqüências-alvo simultaneamente na mesma amostra. A reação foi realizada em um volume final de 20µl contendo: 1U de *Taq* DNA polimerase (Biotools®, RJ, Brasil), 200µM de cada dNTP, 10pmoles de cada iniciador, 10ng do DNA molde e o tampão da reação (10mM Tris-HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂ e 50mM KCl). A amplificação das amostras aconteceu nas seguintes condições térmicas: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, ligação dos iniciadores a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controles negativos da reação foram utilizados 10 ng de DNA de flebotomíneos machos e água e, como controle positivo, 10 ng de DNA de amostras padrões de *Le. amazonensis* e *Le. braziliensis*. Posteriormente, três microlitros do produto da reação foram misturados ao tampão de amostra 2x (0,025g Azul de bromofenol e 0,025g de Xilenocianol e 15% de Ficol diluídos em água ultrapura) e submetidos a eletroforese em gel de acrilamida a 10% a 85 V por uma hora, sendo as bandas visualizadas após coloração pelo brometo de

etéideo ou nitrato de prata com o auxílio de um transiluminador Macro Vue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e fotodocumentadas com o auxílio do programa *Doc-ItLS* (UVP).

3.6 Ensaios de hibridização

As amostras de DNA de flebotomíneos que apresentaram resultado positivo na PCR foram amplificadas como descrito no item 3.5 e os produtos da reação submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Ainda no gel as amostras foram submetidas a desnaturação em solução de 1,5M NaCl e 0,5M NaOH por 25 minutos. Posteriormente o DNA foi transferido por capilaridade para membranas de nylon (Sigma) e fixado através de exposição à luz UV em UVC 500 Crosslinker (GE Healthcare) com energia de 1200 X 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$.

Para a preparação das sondas, os fragmentos de 120 pb obtidos a partir da amplificação de amostras controle de *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* foram submetidos a precipitação com isopropanol 75% e lavado com etanol 70%, para retirada de nucleotídeos não incorporados. Os produtos de PCR purificados foram desnaturados e conjugados com peroxidase utilizando o Kit ECL *Direct Nucleid Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare) para serem utilizados como sonda. As membranas foram hibridizadas com as respectivas sondas em tampão de hibridização (GE Healthcare), por 12 horas a 42°C, lavadas três vezes em tampão SSC 0,5 x contendo 0,4% SDS e 6M uréia e duas vezes em tampão SSC 2x a 42°C. Os sinais positivos foram detectados por quimioluminescência a partir da adição a membrana do reagente de detecção ECL (GE Healthcare) por um minuto, seguido da exposição do filme (HyperfilmTM ECL – GE Healthcare) por quinze minutos à temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante.

3.7 Isolamento de *Leishmania* sp. a partir de amostras clínicas

Biópsias e aspirados de lesões de pacientes provenientes de diferentes municípios do estado de Santa Catarina foram semeadas em 2 ml de meio Schneider (Sigma) suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado a 65°C, 2% de urina humana estéril, 10µg/ml de Penicilina (Sigma) e 10µg/ml de Estreptomicina (Sigma) e cultivados a 26°C. Semanalmente uma alíquota da cultura era retirada e examinada a fresco em microscópio óptico. As culturas positivas foram amplificadas em meio *Schneider's Insect* (Sigma) e parte da amostra foi criopreservada em nitrogênio líquido e incorporada ao banco de cepas do Laboratório de Protozoologia. A outra parte foi lavada duas vezes em tampão salina fosfato pH 7,2 e o sedimento armazenado a -20°C para estudos de identificação.

3.8 Extração de DNA de amostras de *Leishmania* sp., provenientes de cultura e biópsia.

Macerados das biópsias e os sedimentos celulares referentes as culturas padrões e dos parasitos isolados a partir de amostras clínicas foram adicionados de 500 µl de tampão de lise (10mM Tris pH 7,4, 10mM NaCl, 25mM EDTA, 1% SDS, 100 µg/ml proteinase K) e tiveram o DNA extraído pelo método fenol/clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001). Após a precipitação do DNA com acetato de sódio 2M e etanol 100%, gelado, o precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70%, sendo o DNA solubilizado em 50µl de água ultrapura e tratado com RNAse A a 10 mg/ml por 1 hora a 37°C para subsequente quantificação através de espectrofotometria a 260/280nm e armazenamento a -20°C até o seu uso.

3.9 PCR-RFLP

Para a determinação da espécie de *Leishmania* nas amostras de pacientes, o DNA, tanto dos isolados quanto de cultura (18) quanto o das biópsias (124) extraído pelo método de fenol-clorofórmio, foi amplificado por PCR utilizando-se os iniciadores 150 e 152. A reação de amplificação ocorreu nas condições semelhantes às descritas no item 3.5, com alteração somente no volume final de 30 µl e diminuição na temperatura de ligação dos iniciadores para 50°C. Como controle negativo da reação foi utilizada água no lugar de DNA e como controles positivos foram utilizados 10 ng de DNA de amostras de cepas padrões de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. O produto de PCR foi precipitado com isopropanol para uma concentração final de 75%, através de centrifugação a 14.000 x g por 20 minutos e lavado com álcool 70%. Por fim, o produto purificado foi solubilizado em 15ul de água ultrapura e cinco microlitros foram digeridos através das enzimas de restrição *HaeIII*, cujo sitio de restrição esta presente no DNA de *Le. braziliensis* ou *AvaI*, cujo sitio de restrição esta presente no DNA de *Le. amazonensis* (VOLPINI *et al.*, 2004), por 4 horas à 37°C. Os fragmentos digeridos por cada enzima foram separados individualmente em um gel de poliacrilamida 10%, submetido a 85 V por uma hora e meia, corados com brometo de etídeo ou nitrato de prata, visualizados com o auxílio de um transiluminador Macro Vue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e fotodocumentadas com o auxílio do programa Doc-ItLS (UVP).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação do limite de sensibilidade da PCR multiplex:

Nos ensaios de sensibilidade, *pools* de 10 flebótomos machos foram misturados com diferentes quantidades (2.000, 200, 20 e 2) de promastigotas de *Le. braziliensis* oriundas de cultura e submetidos a extração de DNA. O DNA extraído foi submetido a amplificação através da PCR multiplex, sendo possível detectar o kDNA em todas as concentrações de *Le. braziliensis* na presença do DNA de 10 flebótomos, inclusive na correspondente a duas Leishmanias (Figura 8).

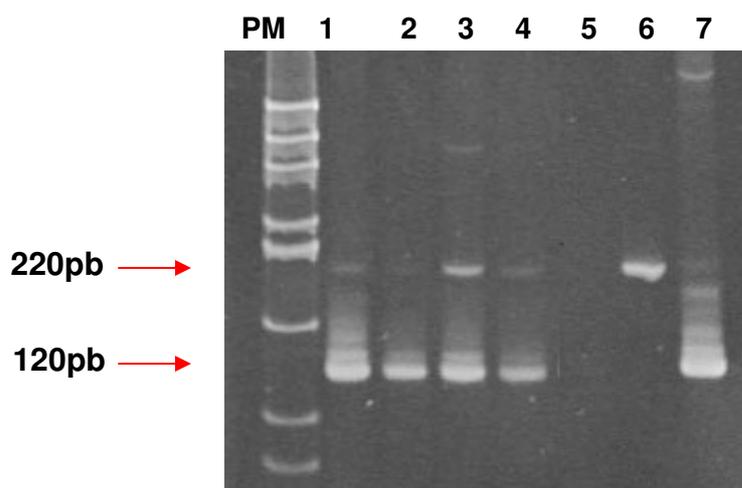


Figura 8 – Gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo, revelando os produtos de amplificação via PCR do teste de sensibilidade com DNA de 10 flebótomos e quantidades diferentes de *Le. braziliensis*. **PM** – padrão de peso molecular (pUC 18 digerido com a enzima *HaeIII*); **1** 2.000 parasitos; **2** – 200 parasitos; **3** – 20 parasitos; **4** – 2 parasitos; **5** – Controle negativo (Água); **6** – Controle positivo - DNA de Flebotomíneo; **7** – Controle positivo - DNA de *Leishmania* spp.

4.2 Aplicação da técnica da PCR para detecção de *Leishmania* spp. em amostras de campo:

Após a determinação das espécies e diferenciação das fêmeas coletadas em campo, estas foram divididas em 107 *pools* de aproximadamente 10 indivíduos (5

pools de *Lu. migonei* e 102 de *Ny. neivai*). Dentre estes, 11 grupos (9,8%) que estavam distribuídos em 7 armadilhas distintas foram positivos, ou seja, foi visualizada a banda correspondente ao kDNA de *Leishmania* sp. Todos os *pools* positivos, tanto os de insetos capturados em 2006 quanto em 2007, são oriundos da mesma região de captura, cuja localização é o Bairro Nossa Senhora da Conceição no município de Piçarras. Os grupos que apresentaram a banda específica para *Leishmania* sp. foram todos provenientes de flebotomíneos da espécie *Ny. neivai*. Interessantemente, quatro grupos positivos pertenciam a uma mesma armadilha e foram coletados em uma mesma noite.

A banda de 220 pb, referente ao gene da cacofonia do inseto, foi observada em todas as amostras amplificadas.

Os resultados foram visualizados em gel de poliacrilamida 10%, corados com brometo de etídeo ou prata e fotodocumentados (Figura 9).

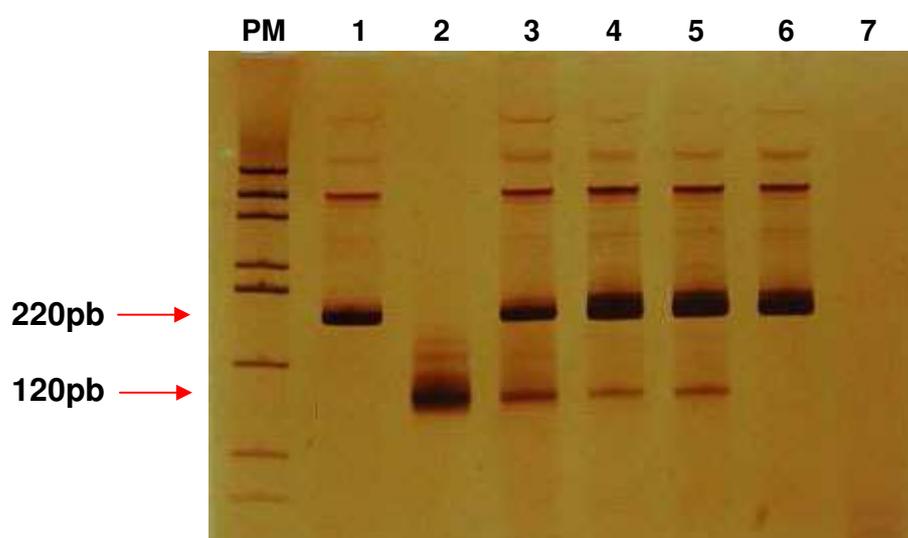


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pela prata, revelando a amplificação do DNA de *Leishmania* sp., em amostras de flebotomíneos capturados nos focos de transmissão. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC18 digerido com a enzima Hae III); **1** – Controle positivo - DNA de flebotomíneo; **2** – Controle positivo - DNA de *Leishmania* spp.; **3 a 5** – Amostras de campo positivas; **6** – Amostra de campo negativa; **7** – Controle negativo (Água).

4.3 Southern Blot:

A técnica de *Southern Blot* foi utilizada para a confirmação das amostras positivas e determinação da espécie de *Leishmania* sp. relacionada a cada amostra de flebotomíneos, utilizando-se sondas direcionadas para os produtos amplificados de 120pb de *Le. amazonensis* e de *Le. braziliensis*. O resultado da hibridização das membranas com as sondas específicas confirmaram a infecção natural de *Ny. neivai* por *Le. braziliensis* (Figura 10).

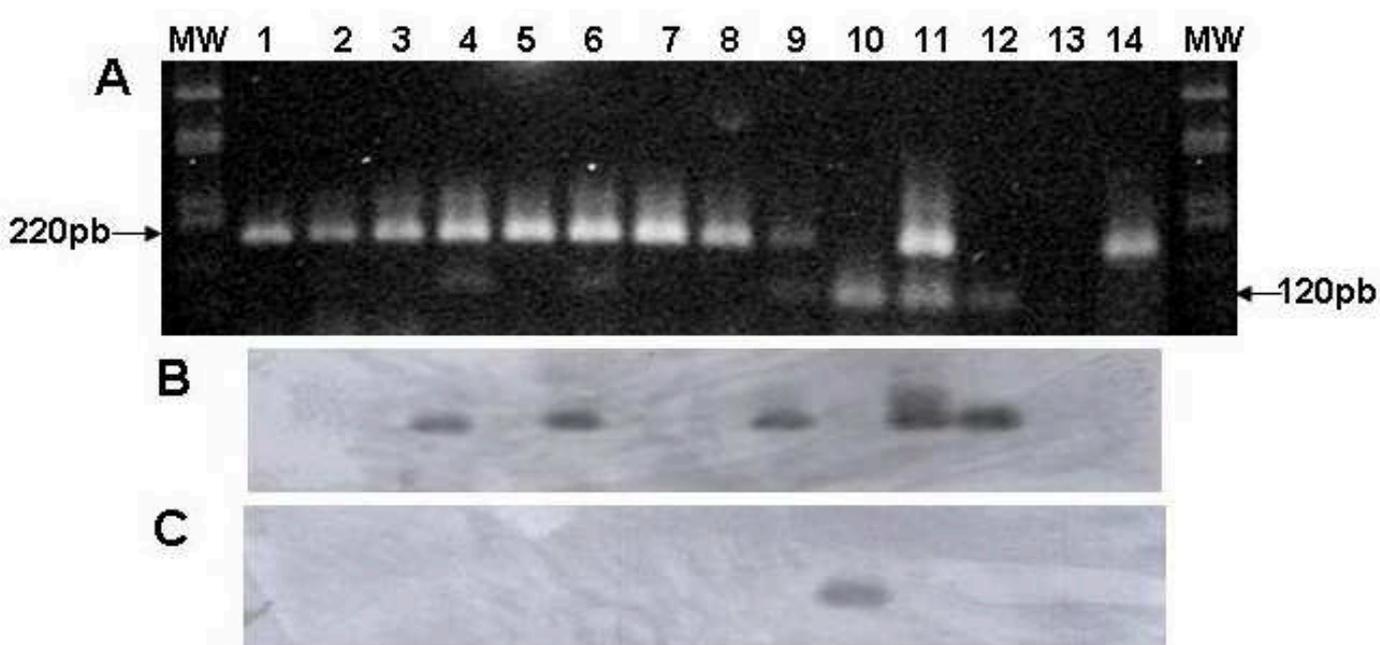


Figura 10 – **A** – Gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídeo dos produtos de amplificação resultantes dos “pools” de flebotomíneos para pesquisa de *Leishmania* sp. PM – Padrão de Peso Molecular (pUC 18 digerido com a enzima HaeIII). 1 a 9 – amostras de campo, 10 – Controle positivo - DNA *Le. amazonensis*, 11 – Controle positivo - DNA Flebotomíneo + DNA *Le. braziliensis*, 12 – Controle positivo - DNA *Le. braziliensis*, 13 – Controle negativo (Água), 14 – Controle positivo- DNA de Flebotomíneo, **B** – Membrana hibridizada com sonda específica de *Le. braziliensis*, **C** – Membrana hibridizada com sonda específica de *Le. amazonensis*

4.4 PCR – RFLP:

No total, 124 biópsias de pacientes foram analisadas, dentre as quais em 18 também foi possível o isolamento de *Leishmania* sp. a partir do aspirado da lesão, totalizando então, 142 amostras.

Tanto as amostras provenientes de biópsias quanto as culturas isoladas tiveram seu DNA extraído e foram submetidas a amplificação pela PCR multiplex, apresentando a banda esperada de 120pb. Este resultado confirma a aplicação da técnica tanto para amostras isoladas quanto diretamente do material coletado inicialmente para diagnóstico, reforçando a robustez e a sensibilidade do método empregado.

Após a digestão com as enzimas *Ava*I e *Hae*III (Figuras 11 e 12), 123 pacientes (dos quais 17 também foram testados as culturas) apresentaram padrões de bandas correspondentes a *Le. braziliensis* e um a *Le. amazonensis*. A amostra cujo resultado apontou infecção por *Le. amazonensis* também possuía material isolado de *Leishmania* sp. obtido a partir de aspirado de lesão. Desta forma, tanto para DNA proveniente da biópsia quanto para o DNA oriundo de aspirado o padrão de digestão foi igual ao controle de *Le. amazonensis*.

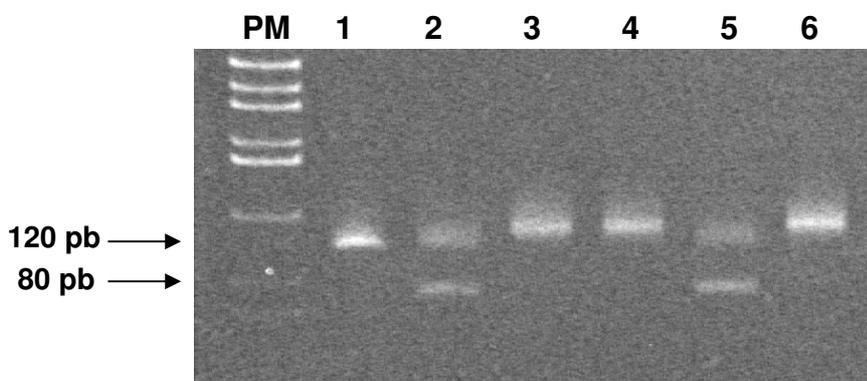


Figura 11 – Gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etideo, representativo dos produtos de PCR obtidos a partir de amostras clínicas digeridos com a enzima *Ava*I. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUC 18 digerido com a enzima *Hae*III), **1 a 4** -

amostras de pacientes, **5** – Controle positivo - *Le. amazonensis*, **6** – Controle positivo – *Le. braziliensis*.

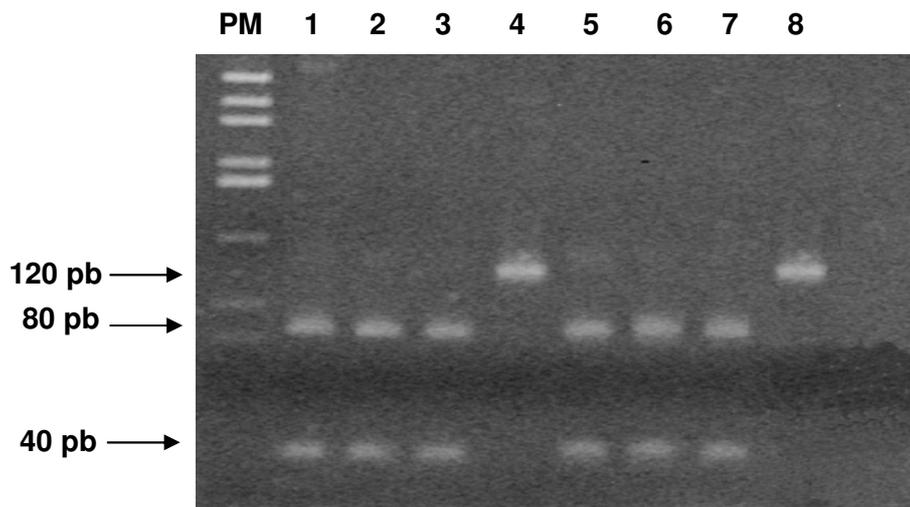


Figura 12 – Gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etideo, representativo dos produtos de PCR obtidos a partir de amostras clínicas digeridos com a enzima *HaeIII*. **PM** – Padrão de Peso Molecular (pUOC 18 digerido com a enzima *HaeIII*), **1 a 6** - amostras de pacientes, **7** – Controle positivo - *Le. braziliensis*, **6** – Controle positivo – *Le. amazonensis*.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, observa-se que a LTA está em franca expansão geográfica, uma vez que casos da doença já foram notificados em todos os Estados (COSTA *et al.*, 2007). Embora tenha sido registrada uma diminuição no número de casos na década de 50, nos últimos vinte anos constatou-se um significativo crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica. Além disso, a doença que originalmente estava altamente associada com o contato do indivíduos com a mata, atualmente também é registrada em focos periurbanos e urbanos (COSTA *et al.*, 2007).

No Sul, de 1980 a 2003, registraram-se 12.304 casos da doença, dos quais, 99,3% no Estado do Paraná, com notificação em 289 dos 399 municípios, especialmente no norte e oeste (LIMA *et al.*, 2002).

Em Santa Catarina, novos focos têm surgido a partir da década de 90, com o auge de casos positivos autóctones em 2006. Recentemente foi confirmado no Laboratório de Protozoologia o primeiro caso de transmissão autóctone da doença no município de Florianópolis (dados não publicados).

Em virtude do crescente número de casos de LTA no Estado e a falta de dados epidemiológicos, clínicos e vetoriais, nosso grupo vem desenvolvendo diferentes estudos interinstitucionais e multidisciplinares que possam contribuir para a compreensão e controle dos focos de LTA no Estado. Estudos de caracterização clínica, biológica e epidemiológica são fundamentais para que possam ser elaboradas estratégias de ação e prevenção individualizadas, visto que os padrões de transmissão, espécies vetores, espécies de *Leishmania*, resposta ao tratamento podem apresentar-se de forma muito distinta em diferentes regiões.

Assim, com o intuito de ampliar o conhecimento da epidemiologia da doença e possibilitar possíveis medidas de controle, o presente estudo permitiu realizar a identificação dos locais onde os flebotomíneos capturados no município de Piçarras

estavam naturalmente infectados por *Leishmania* sp., a determinação da espécie de envolvida na transmissão da doença no local e ainda as espécies de *Leishmania* sp. presentes em amostras de pacientes de casos autóctones da doença provenientes de todo o estado de SC. Este trabalho foi possível devido ao fato do Laboratório de Protozoologia, onde foi desenvolvido o estudo, ser referência no diagnóstico de Doença de Chagas e de Leishmaniose em Santa Catarina, recebendo assim amostras de pacientes oriundas de todo o Estado.

A utilização de métodos moleculares possibilitou maior rapidez, possibilitando o teste de vários indivíduos em um curto espaço de tempo. Além disso, a sensibilidade da técnica utilizada foi considerada satisfatória, sendo possível a detecção da banda de 120pb correspondente a *Leishmania* sp. em uma amostra de DNA extraído de 10 flebotomíneos, com apenas 2 parasitos. Mesmo depois da manipulação decorrente da técnica de extração de DNA, onde geralmente ocorre uma perda da quantidade de material, foi possível identificar o DNA do parasito. Assim, pode-se considerar que a técnica de extração utilizada foi bastante eficiente para o isolamento do DNA genômico das duas espécies, permitindo a detecção do DNA de dois parasitos na presença do DNA de 10 flebótomos.

Em todo o Brasil estudos dessa natureza são realizados visando identificar espécies de vetores e de parasitos envolvidos na transmissão da Leishmaniose em cada local. O presente estudo revelou, nas amostras obtidas no município de Piçarras, pela primeira vez a infecção natural de *Ny. neivai* por *Le. braziliensis* no Brasil (MARCONDES *et al.*, *in press*).

Nas capturas feitas tanto em 2006 quanto em 2007 flebotomíneos positivos foram encontrados no mesmo local (Bairro Nossa Senhora da Conceição). Os locais escolhidos para captura foram determinados com base em um trabalho prévio, onde foi realizado um inquérito intradérmico para LTA no município de Piçarras, que

revelou 15,6% dos escolares daquela região estavam com reação positiva, apesar de nenhum deles apresentar lesões características (SIMON & FERNANDES, 2006; EGER, et al., 2008). Os locais que apresentaram maiores taxas de Reação de Montenegro positiva em escolares foram os bairros Nossa Senhora da Conceição, Nossa Senhora da Paz e Santo Antônio (SIMON & FERNANDES, 2006; EGER, et al., 2008). Desta forma, além desses locais foram realizadas capturas de flebotomíneos no bairro centro, que está situado entre essas localidades (Figura13).

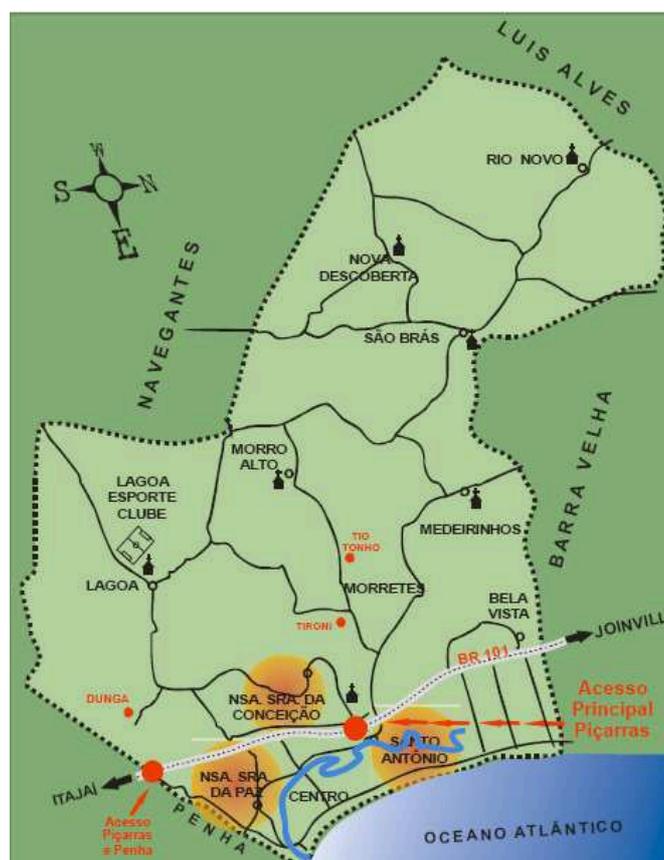


Figura 13 - Mapa do município de Piçarras apresentando áreas demarcadas em cor laranja onde houve maior prevalência de estudantes reatores ao teste intradérmico de Montenegro (segundo SIMON & FERNANDES, 2006).

Dos flebotomíneos capturados em 2006 nas referidas áreas, todos foram analisados no presente estudo. Os que foram capturados em 2007 somente um terço dos flebotomíneos foi submetido a detecção da infecção por *Leishmania* sp,

sendo todos provenientes do bairro Nossa Senhora da Conceição. Todos os *pools* positivos encontrados tanto de 2006 quanto de 2007 foram de insetos capturados no bairro Nossa Senhora da Conceição, provavelmente devido a essa discrepância no número de flebotomíneos testados entre as quatro regiões.

Todas as áreas onde foram feitas coletas apresentavam características propícias para a transmissão da doença, como o fato de estarem localizadas perto de locais onde foram detectados casos humanos da doença (15 casos de leishmaniose nos últimos 5 anos segundo Machado, 2004), com potenciais reservatórios e proximidade com áreas de mata degradada (SIMON & FERNANDES, 2006).

A presença de pequenas áreas de matas residuais peridomiciliares nos bairros onde foram realizadas as coletas pode ser um fator de risco para a transmissão de LTA. O risco de infecção, classicamente atribuído às formas de ocupação dos ambientes florestais pelo homem, vem ressurgindo com outra feição em áreas onde focos ativos da doença sobreviveram em pequenas matas residuais, havendo urbanização da LTA. Neste padrão de transmissão observa-se a adaptação dos agentes e vetores aos novos ambientes, com envolvimento de animais domésticos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Estudos recentes realizados por Córdoba-Lanús et al. (2006), apontam a infecção natural de *Ny. neivai* nas províncias de Tucumán e Salta na Argentina, sendo que nesses locais a espécie em questão é responsável por 95% das infecções. O fato de existir *Ny. neivai* infectados por *L. (Viannia)* sp. em regiões tão distantes, quanto Argentina e Piçarras (mais de 1600 km de Buenos Aires para Piçarras / Salta), e distintas (Litoral / Andes) sugere a existência de similaridade na biologia e provavelmente no papel epidemiológico deste espécie no ciclo da LTA.

A detecção de infecção dos flebotomíneos (*Lu. neivai*) por *Leishmania braziliensis* em 9,8% dos *pools* examinados, corrobora os resultados descritos por Córdoba-Lanús *et al.* em 2006 na Argentina, onde os autores encontraram 9,1% dos *pools* de flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* positivos para *Le. braziliensis*. Miranda e colaboradores, em 2002, utilizando PCR específico para *Leishmania* sp, encontraram 8,9% dos grupos coletados, positivos para o parasito.

Embora flebotomíneos não tenham sido utilizados como bioindicadores, a espécie *Ny. neivai* é freqüentemente encontrada próxima de domicílios e parece estar associada a áreas muito modificadas. Estudos preliminares no município de Piçarras indicaram que *Ny. neivai* é a espécie predominante no peridomicílio onde a vegetação está degradada. (MARCONDES *et al.*, 2005). A presença desta espécie na área peridomiciliar, sua a predominância no local (98%), acrescido do encontro de infecção natural e a ocorrência de casos humanos de LTA, sugerem fortemente que *Ny. neivai* seja o vetor de *Le. braziliensis* na região. Entretanto, estudos adicionais visando o isolamento e a transmissão do parasito em modelos experimentais são necessários para incriminar definitivamente a espécie como a responsável pela transmissão da LTA.

Cabe salientar que as regiões de coleta estão situadas próximo da costa marítima, a qual é intensamente visitada turistas. Desta forma, a presença de flebotomíneos infectados na região constitui um risco para transmissão da parasitose o que poderá ocasionar em curto e médio prazo impacto econômico local. O aumento nos casos de leishmaniose poderia não só afetar diretamente o turismo na região, mas também constituir uma rota de saída da Leishmaniose para fora das áreas endêmicas. Apesar de o homem não ser considerado fonte de infecção tradicional para os flebotomíneos, essa possibilidade ainda existe devido ao parasito

estar presente no sangue periférico, mesmo em pacientes considerados clinicamente curados.

A identificação das espécies de *Leishmania* sp. isoladas dos pacientes demonstrou a presença de duas espécies em Santa Catarina: *Le. amazonensis* e *Le. braziliensis*, corroborando dados anteriores no Estado (GRISARD *et al.*, 2000, MACHADO, 2004). O DNA de *Leishmania* sp. amplificado a partir de amostras clínicas dos pacientes apresentaram o mesmo padrão de digestão com as enzimas *HaeIII* e *AvaI* tanto para a amostra proveniente de cultura isolada do paciente, quanto para a biópsia, confirmando a presença do parasito antes do isolamento, afastando a possibilidade de contaminação de cultura.

O subgênero *Le. amazonensis* foi observado primeiramente na região Amazônica. A sua distribuição tem aumentado pelo território brasileiro, com casos autóctones sendo descritos na região sudeste, em locais onde a doença humana é relativamente rara (Brasil, Ministério da Saúde, 2000). Estudos recentes feitos no estado de São Paulo demonstraram em casos autóctones de LTA a presença da *Le. amazonensis* (MEDEIROS *et al.*, 2008).

No presente estudo, todos os insetos positivos foram da espécie *Ny. neivai* e a estavam infectados pela espécie *Le. braziliensis*. A presença de *Le. amazonensis* em pacientes sugere que outras espécies de vetores podem estar envolvidas na transmissão da parasitose. O vetor principal dessa espécie no Brasil são flebotomíneos das espécies *Lu. flaviscutellata* (WILLIAMS, 2003). Martins *et al.*, (2008), descreveram a espécie *Lu. withmani* infectada artificialmente por *Le. amazonensis*, sugerindo que ela também seja um possível vetor, apesar de nunca ter sido encontrada naturalmente infectada. No estado de Santa Catarina, nenhuma dessas espécies de flebotomíneos foi encontrada nas coletas feitas em 2006 e 2007 na cidade de Piçarras. A *Lu. migonei*, outra espécie também encontrada em Santa

Catarina, aparece na literatura segundo Williams, 2002 infectada somente por *Le. braziliensis*, sem nenhum registro de infecção por *Le. amazonensis*. A espécie *Ny. neivai* representa cerca de 98% dos flebotomíneos coletados e ela está associada ao parasito *Le. braziliensis* que foi detectado em 123 pacientes, já o vetor da *Le. amazonensis* não foi ainda determinado. Considerando, que casos autóctones de LTA por *Le. amazonensis* foram descritos em pacientes do Oeste do Estado e da região do litoral norte e do Vale do Itajaí, o vetor envolvido na transmissão deve apresentar uma distribuição geográfica ampla. Desta forma, estudos adicionais para o conhecimento da fauna de flebotomíneos do Estado necessitam ser ampliados para outras regiões.

Os dados obtidos no presente estudo são de grande relevância para orientar os estudos de biologia e da dinâmica de transmissão nos focos da doença e ainda aumentar o conhecimento de aspectos epidemiológicos relevantes da parasitose na região. Estas informações serão encaminhadas para a Divisão de Vigilância Epidemiológica do Estado para ajudar na criação de um mapa detalhado da distribuição dos casos clínicos e identificar as áreas de maior risco de transmissão da doença visando implementar as ações de controle.

6. CONCLUSÕES

- A pesquisa da infecção natural dos flebotomíneos capturados em Piçarras apontou a infecção natural da espécie *Ny. neivai* por *Leishmania braziliensis*.
- Todos os flebotomíneos positivos foram capturados no bairro Nossa Senhora da Conceição, localidade onde foram também encontrados casos humanos de LTA;
- A técnica da PCR Multiplex, mostrou-se eficiente na detecção do kDNA de *Leishmania* nos flebotomíneos;
- Foi possível isolar 18 cepas de *Leishmania* sp. a partir de aspirados e biópsias da lesão de pacientes;
- A LTA em Santa Catarina é causada pela *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, sendo a *Le. braziliensis* encontrada em 99,2% dos casos;
- Tanto PCR-RFLP quanto *Southern Blot* se mostraram técnicas eficientes na identificação da espécie de *Leishmania* sp. que estava infectando pacientes e flebotomíneos.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE FILHO, J.D.A.; GALATI, E.A.B.; FALCÃO, A.L.. Redescription of *Nyssomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 98, p. 1059-1065, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, M.S.;2000.

CHENIK, M.;LAKHAL, N.; KHALEF, B.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania* major parasites. **Parasitology**, v. 132, p. 493-509, 2006.

COLLINS, F. H.; MENDEZ, M. A.; RASMUSSEN, M. O.; MEHAFFEY, P. C.; BESANKY, N. J.; FINNERTY, V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. **A. J. of Trop. Medicine and Hygiene**, v. 37(1), p. 37-41, 1987.

CÓRDOBA-LANÚS, E.; DE 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.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J.C.; LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102(2), p. 149-153, 2007.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol**, v. 72, p. 132-141, 2002.

EGER-MANGRICH, I.; SCHOLL, D.; GRISARD, E.; STEINDEL, M. Levantamento clínico epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana diagnosticados no Estado de Santa Catarina no período de 2003 a 2005. **Reunião de Pesq. Aplic. em Doença de Chagas e Leishmanioses**. Uberaba, MG , 2005.

EGER, I ; SIMON, R. F. ; FERNANDES, R. O. ; MACEDO, I.T.S. ; CANIATO, V.M. ; MATTOS, M.S. ; STEINDEL, M. . Inquérito intradérmico para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Piçarras, Santa Catarina. **44º Congresso Brasileiro da Soc. Brás. de Med. Tropical**. Porto Alegre, RS, v. 41. p. 207, 2008.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. *In* **Parasitologia Humana** NEVES, D. P. Editora Atheneu, 10ª edição, p.97-100, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO L.B. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOMES, A.C.; SANTOS, J. L. F.; GALATI, E.A.B. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. Observations on the endophilic behavior of the sandfly and

the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. **Revta. Saúde Públ.** V. 20, p. 280-287, 1982.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; CARVALHO-PINTO, C. J., EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H. K.; LIMA, J. H.; ROMANHA, A. J.; CAMPBELL, D. A. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina state, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 74, p. 89-93, 2000.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-70, 2000.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Mol. and Biochem. Parasitol**, v. 152, p. 35-46, 2007.

LIMA, A.P.; MINELI, L.; TEODORO, U.; COMUNELLO, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **An Brás Dermatol**, v.77, p.681-92, 2002.

LIMA, H. C. ; RANGEL, R. C. T. ; GRISARD, E. C. ; KOERICH, L. B. ; STEINDEL, M. . Report of the southernmost foci of human cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2000, Cartagena de Indias. Abstracts. Santa Fé de Bogotá, v. 2. p. 115, 2000.

LIMA FILHO, J.H.C. ; STEINDEL, M. Aspectos clínicos e Epidemiológicos da Leishmaniose Cutânea no Estado de Santa Catarina. **Arq. Cat. Med.**, v. 27, p. 25-31, 1998.

LYNN, M. A.; MCMASTER, R. W. Leishmania: conserved evolution – diverse diseases. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 103-105, 2008.

MACHADO P. E. Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania* spp. em amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina 64pp, 2004.

MARCONDES, C.B., DAY, J.R., READY, P.D. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 91, p. 725-726, 1997.

MARCONDES C.B. ; CONCEIÇÃO, M. B. E.; 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). **Rev. Soc. Bras. Med Trop**. v. 38, p. 353-355, 2005.

MARCONDES C. B.; BITTENCOURT I. A. ; STOCO P. H.; EGER I.; GRISARD E. C.; STEINDEL, M. First report of natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) sp. in Brazil . **Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg**. *In process*.

MARTINS, A. R. P.; FONTELES, R. S.; AZEVEDO, P. C. B.; PEREIRA, Y. N. O.; LOBATO, K. S.; MORAIS, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F.; REBÊLO, J. M. M.; KUPPINGER, O. Detecção molecular da infecção de *Lutzomyia withmani* por *Leishmania amazonensis* em condições experimentais. 44° Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, Bahia, 2008.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MEDEIROS, A. R.; SILVA JR, W. A.; ROSELINO, A. M. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American Tegumentary Leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Clinical Science** v. 64, p. 451-456, 2008.

MIRANDA, J.C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M.G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 185–188, 2002.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-77, 2005.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; MALAFRONTA, R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, p. 252–259, 2006.

PEIXOTO, A. A.; GOMES, C. A.; DE AMORETTY, P. R.; LINS, R. M.; MEIRELES-FILHO, A. C.; KYRIACOU, C. P. New molecular markers for phlebotomine sand flies. **Int J Parasitology**. v. 31, p.635-639, 2001.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.; BATES PA,MAINGON, R.D. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, p. 875-882, 2008.

ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; COUPPIÉ, P.; PRATLONG, F.; NACHER, M.; DEDET, J. P.; CARME, B. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify the Main New World *Leishmania* Species and Analyze Their Taxonomic Properties and Polimorphism by Application of the Assay to Clinical Samples. **J of Clin Microbiology**. v. 44, p. 459-467, 2006.

SÃO THIAGO, P.T.; GUIDA, U. Leishmaniose Tegumentar no oeste de Santa Catarina: (Brasil). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, p. 201-203, 1990.

SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, v. 3, 2ª edição, 2001.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-235, 2004.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their applications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471-478, 1994.

SIMON, R. F.; FERNANDES, R. O. Inquérito intradérmico para Leishmaniose Tegumentar Americana no município Piçarras, Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Medicina, Universidade do Vale do Itajaí, 41pp, 2006.

SILVA, E.S.; PACHECO, R.S.; GONTIJO, C.M.F.; CARVALHO, I.R.. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Rev do Inst de Med Trop de São Paulo**, v. 44, p. 145–149, 2002.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R. ; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA J. C.M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp Parasitology**, v. 119. p. 343–348, 2008.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, p.31-37, 2004.

WEIGLE K.A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D.C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J Clin Microbiol**. v.40. p. 601-606, 2002.

WILLIAMS, P., O. Phlebotomidae *In Parasitologia Humana* NEVES, D.P. editor. Editora Atheneu, 10a edição, p. 370-382, 2003.

<http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html> World Health Organization. Acessado em: 05/11/2008.

8. ANEXO

Artigo aceito para publicação na revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

First report of natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* sp. in Brazil

Carlos Brisola Marcondes^{a+}, Ize A. Bittencourt^a, Patricia H. Stoco^a, Iriane Eger^b, Edmundo C. Grisard^a and Mário Steindel^a

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil;

^bVale do Itajaí University, 88302-202 Itajaí, Santa Catarina, Brazil.

Summary A study of the natural infection of Phlebotomine sand flies by *Leishmania (Viannia)* was conducted in a focus of cutaneous leishmaniasis in Piçarras, in the north-eastern coast of the Brazilian state of Santa Catarina. Five hundred sixty-two female *Nyssomyia neivai*, collected by miniature light traps near houses, were separated in 61 pools, and examined by PCR and southern blot hybridization. Eight pools, four of them from the same light trap/night, were positive. This is the first finding of natural infection by *L. braziliensis* of adequately identified *Ny. neivai* in Brazil. In this preliminary observation we have observed the abundance and predominance of *Ny. neivai* among the captured Phlebotomine species (98.5%), indicating *Ny. neivai* may be the dominant vector of *Leishmania* of the subgenus *Viannia* in this area.

Key-words: Phlebotomine sand flies, *Nyssomyia neivai*, *Leishmania (Viannia)*, Brazil, cutaneous leishmaniasis.

⁺ Corresponding Author: Tel.: +55 48 3721 5208, Fax: +55 48 3721 9258
E-mail address: cbrisola@mbox1.ufsc.br. (C.B. Marcondes)

1. Introduction

Phlebotomine sand flies of the *Nyssomyia** *intermedia* species complex [*Ny. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Ny. neivai* (Pinto, 1926)] (Andrade Filho et al., 2004; Marcondes, 1996) are widely distributed in South America and well adapted to altered environments (Gomes et al., 1982). The species can be differentiated using morphological characteristics (Andrade Filho et al., 2004; Marcondes, 1996), besides differences in mitochondrial DNA (Marcondes et al., 1997). Morphology of spermathecae and its ducts, as well as the number of cibarial horizontal teeth, distinguish the species of the *Lu. intermedia* complex (Andrade Filho et al., 2004; Marcondes, 1996).

Ny. intermedia is collected mostly in wetter and warmer regions of Brazil, from the east of São Paulo state to the north (Goiás, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais and Rio de Janeiro states), besides a locality (Miranda Municipality), in Mato Grosso do Sul state, while *Ny. neivai* is collected mostly in drier and cooler areas in this country, from the west of the Minas Gerais state to the west (Mato Grosso do Sul, Goiás and Pará states) and to the south of Brazil (the area in São Paulo state situated to the west of Serra do Mar, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul states), as well as nearby countries (Paraguay, Argentina and Bolivia) (Andrade Filho et al., 2004; Marcondes et al., 1998). In Paraná state, *Ny. neivai* is the predominant species in some municipalities while *Ny. whitmani* predominates in others. The distribution in this state appears to be related to the soil type, which is sandy in those areas with more *Ny. neivai* (Teodoro et al., 2006).

Since 1997, cutaneous leishmaniasis has been reported in several municipalities in the coastal north-eastern areas of the Santa Catarina State, in southern Brazil, where the disease

* Taxonomy for Phlebotominae of Galati (2003) is here adopted. Genera of sand flies were abbreviated as proposed by Marcondes (2007).

had not been previously reported (Grisard et al., 2000). From March to May 2000, sand flies were collected by CDC-like light traps at Piçarras (Marcondes et al., 2005), and collections were carried out in the same area again in March 2006, at which time females were analysed by PCR.

2. Materials and methods

2.1. Collection of insects – Phlebotomine sand flies were collected in six nights of March 2006 (end of summer), near human domiciles in several localities (Conceição, Santo Antonio, Centre and BR-101 km 102) (26°46'47"S 48°41'45"W to 26°44'26"S 48°40'46"W^{**}, 18 m a.s.l.), in an area of about 2.5km², in Piçarras Municipality (Figure 1) by 12 CDC-like light traps. Insects were dissected, immersing the distal part of the abdomen in sodium hydroxide at 10% for 12 hours; spermathecae and ducts were examined, counting the number of rings and observing the “head” of the first, and checking the ratio individual duct/common duct. *Ny. neivai* females were pooled, after identification. Similar collections, utilising six traps for ten nights, were developed in the same area in March-April 2000. No examination for *Leishmania* infection was developed in these insects.

2.2. DNA extraction - Female flies were pooled in to groups of ten individuals, and crushed with disposable pestles in 500µl of lysis buffer (0.08 M NaCl, 0.16 M sucrose, 0.06 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6) (Collins et al., 1987) and incubated with 5 µl of proteinase K (20mg/ml) at 65 °C for 2 hours. After adding potassium acetate to a final concentration of 2M, the suspension was incubated for 30 min. at 4 °C, centrifuged at room temperature for 10 min. at 12,000 x g and the supernatant was removed for isopropanol precipitation of the DNA. The pellet was then washed twice at 12,000 x g in

^{**} According to Google Earth

cold 70% ethanol and the pellet resuspended in 30 µl of ultra-pure water containing of RNase A (10mg/ml), incubated at 37 °C for 1 hour and stored at -20 °C until use. Specific primers for Phlebotomine sand flies (PhS1 - 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' and PhS2 - 5' CCACGAACAAGT TCAACATC 3') directed to a sequence of 220 bp of the Phlebotominae cacophony gene ORF (Peixoto et al., 2001) were used in PCR tests as control of DNA extraction and to assess the absence of inhibitors. Different concentrations (1,000, 100, 10 and 2) of *L. braziliensis* culture promastigotes were added to groups of ten male flies and submitted to DNA extraction as described above and used for PCR sensitivity assay.

L. (V.) braziliensis (MHOM/BR/75/L-2904) and *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) cultures in exponential growth phase were washed twice in 1 x PBS and submitted to DNA extraction performed by standard phenol/chlorophorm method (Grisard et al., 2000). After extraction DNA was resuspended in 50 µl of ultra-pure water and incubated with RNase A (10mg/ml) at 37 °C for 1 hour and stored at -20 °C until use.

2.3. PCR detection of *Leishmania* infection – Primers 150 (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT (C/G)CGAA-3') and 152 (5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC-3' directed to the kDNA minicircle were used to detect *Leishmania* in sand fly pools (Volpini et al., 2004). Briefly, the PCR reaction was performed in a buffer containing 10mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 pmol of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 2µl of DNA sample diluted at 1:10 and 1:100 in a final volume of 20 µl. DNA amplification was performed in a Mastercycler Gradient apparatus (Eppendorf) using the following thermal conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min., 30 cycles of 94 °C for 1 min.,

annealing at 57 °C for 1 min., extension at 72 °C for 1 min. followed by an final extension step at 72 °C for 5 min.

Tubes containing *Ny. neivai* male DNA and no DNA were used as negative controls and *L.(V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* DNA were used as positive controls. Three microlitres of the PCR amplified products were resolved in 10% polyacrylamide gels stained with ethidium bromide, visualized under UV light and digitally recorded. Precautions to avoid cross-contamination were carried out during all PCR steps.

Two PCR amplified minicircle kDNA fragments of standard *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* strains were used as probes in subsequent southern blot assays. The amplified fragments were isopropanol precipitated and labelled with horseradish peroxidase using the ECL Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare). After resolving the PCR amplified products of each pool on 2% agarose gels, the products were blotted onto a charged nylon membrane (Sigma). After UV cross linking, southern blot hybridizations were carried out overnight at 42°C in Gold hybridization buffer (GE Healthcare). Membranes were then washed three times in 0.5 x SSC/0.4% SDS, 6M urea and then 2 x SSC at 42°C and the positive signals were detected by incubating the membrane in ECL detection reagents for 1 min. and film was exposed for 15 minutes as suggested by the manufacturer.

3. Results

From sixty-seven trap/nights, 27 were positive, with 2,304 insects, of which 620 were females of *Ny. neivai*, and most of this material was analysed. From the 61 pools (562 insects) analysed in this study, a 220 bp band specific for the Phlebotominae cacophony gene was detected in all pools, indicating a DNA fidelity of and the absence of PCR inhibitors. Sensitivity assays carried out using ten male Phlebotominae and different

concentrations of cultured *Leishmania* sp. promastigotes DNA showed that it was possible to detect the specific kDNA PCR fragment corresponding to two promastigotes in the presence of DNA of ten sand flies (Fig. 2). The specific 120 bp fragment of the *Leishmania* sp. kDNA minicircle fragment amplified by PCR using primers 150/152 was obtained for 8 out of 61 pools tested (13.1%) (Table 1, Fig. 2A), with four of the positive pools from a single trap and night. No amplification was observed in the negative controls in any assay. Specific identification of the amplified fragment was confirmed by southern-blot hybridization, using *L. braziliensis* and *L. amazonensis* specific probes (Fig. 2B and C).

Positive sand flies were collected from four distinct locations on both sides of BR-101 highway which crosses the Brazilian territory from North to South, including the Piçarras Municipality (Figure 1). These points were well scattered within the area where human cases were detected in this municipality. We have observed a great difference between the numbers of captured *Ny. neivai* in this area when comparing collections in year 2000 to those in 2006 (85 vs. 2,269). From fifty-five trap/nights in 2000, 25 were positive for sand flies, while in 2006 sixty seven trap/nights, 27 of which positive, were obtained. Collections of 2000 were concentrated in Conceição, while those of 2006 were done on both sides of BR-101 (Figure 1). Williams' means (Bidlingmayer, 1969) for 2000 and 2006 were respectively 1.94 and 7.78 sand flies/trap/night.

Female sand flies of other species (*Migonemyia migonei* and *Psathyromyia lanei*) (five insects) captured during the herein described field studies will be object of a future study.

4. Discussion

Natural infection of *Ny. intermedia* by *L. braziliensis* had been observed in Rio de Janeiro (Pita-Pereira et al., 2005; Rangel et al., 1984), and it was experimentally confirmed by

Rangel et al. (1992). *Ny. intermedia* s.l. was reported to be naturally infected by *Leishmania* at the Ribeira River Valley, in São Paulo state (Castro et al., 2005), and infected with *L. braziliensis* (Silva and Gomes, 2001). The essential identification of the species, in a region where both species occur (Marcondes et al., 1998) was not performed, and they can only be considered as *Ny. intermedia* s.l.. Also, *Ny. neivai* was recently found to be infected by *L. (Viannia)* sp. in the Argentinean North-western provinces of Salta and Tucumán (Cordoba-Lanus et al., 2006).

Although the sister species of *Ny. neivai* (*Ny. intermedia*) had been reported as naturally infected (Pita-Pereira et al., *loc. cit.*; Rangel et al., *loc. cit.*), the present work is the first confirmed report of a *Ny. neivai* infected by *L. (Viannia)* sp. in Brazil. The previous report of *Ny. intermedia* s.l. naturally infected by this protozoa species in Conchal, São Paulo state (Casanova et al., 1995) was published before the resurrection of *Ny. neivai* (Marcondes, 1996). Considering that Conchal (22°19'49"S 47°10'21"W) is located west of Serra do Mar, and the distribution of the species of this complex in São Paulo State (Andrade Filho et al., 2007; Marcondes, 1996), we may consider that these flies are most likely *Ny. neivai* rather than *Ny. intermedia*, but a careful review of the collected material should be performed to confirm this assertion.

The presence of positive sand flies in places over a relatively large collection area (see the footnotes in Table 1) poses a serious public health problem. One of the locations (1 in Table 1 - 26°44'50.0 S 48°40'50.0 W) is situated at ca. 400 m from the seacoast, just besides the second avenue. It has a house with a small orchard, corn, hens and dogs; it is situated near a small creek, from which capybaras invade the corn plantation, disturbing the dwellers. Due to the presence of infected sand flies in a place so near the beach, where thousands of tourists live in the summer months, cases of cutaneous leishmaniasis can be expected in people from outside the endemic region, to be adequately diagnosed.

Since a great number of migrants, mostly from Paraná state, where cutaneous leishmaniasis is frequent (*e.g.*, Silveira et al., 1996) have established in the area, the source of the protozoa remains unexplained. The distribution of infected sand flies in the area, which is being more thoroughly studied, does not indicate a recent introduction by migrants.

In the present study we found *Ny. neivai* as the predominant species in the neighbourhood of human dwellings at Piçarras municipality, where 15 cases of cutaneous leishmaniasis have been reported in the last five years (Steindel - unpublished results). Taken together with the finding of natural infection by *Leishmania* of the subgenus *Viannia* sp., it is suggested that *Ny. neivai* may be the vector of *Leishmania* sp. in this area. However, careful dissection of insect for detection of metacyclic promastigotes in their midgut and inoculation of flagellates in hamsters' footpads should be necessary to confirm *Ny. neivai* as vector in this area. In Argentina, *Ny. neivai* is also a very predominant species in foci of cutaneous leishmaniasis, usually constituting more than 95% of the total of collected sand flies (Salomón et al., 2002, 2004). The finding of *Ny. neivai* infected by *L. (Viannia)* sp. in such distant (more than 1,600 km from Piçarras to Tucumán/Salta) and distinct (Coastal/Andean) areas indicates the existence of similarity in the biology and probably in the epidemiological role of this sand fly.

Even considering that *Ny. umbratilis* (Ward & Frahia, 1978), the most important vector of *L. guyanensis*, is frequently collected in Recife, in the north-east of Brazil (Balbino et al., 2005), this protozoon has been reported only in the Amazonian region of Brazil and nearby countries (Falqueto and Ferreira, 2005). Thus, we may consider that *Ny. neivai* is probably infected by *L. (V) braziliensis* in Piçarras. However, cross hybridization experiments with specific *L. (V) guyanensis* probes would be necessary to corroborate this hypothesis.

In the north-west area of the Rio Grande do Sul state (Brazil), Silva and Grunewald (1999) analysed by PCR 920 sand flies (40 of them *Ny. neivai*) of eight species, and reported infection of *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940) and *Pi. misionensis* (Castro, 1960) by *L. (Viannia)* sp. This is a forested area within a preserved park, where the Phlebotominae fauna is quite diversified. Phlebotomine sand flies have not been used as bioindicators, but the frequent finding predominant *Ny. neivai* populations near human domiciles (*e.g.*, Salomón et al., 2002, 2004; Teodoro et al., *loc. cit.*) seems to indicate that this sand fly is highly associated with such modified areas.

Acknowledgements: We are grateful to Dr. Vinicius Machado Caniato and to Mr. André Ladvik (Secretaria Municipal de Saúde – Piçarras, SC, Brazil) for their help in field work and to Dr. Cláudio Casanova (SUCEN/SES, Mogi Guaçu, SP, Brazil) for the donation of *Ny. neivai* from his colonies. We thank to FAPESC/SUS (Proc. 14814/2005/8) and CNPq for the financial support. P. H. Stoco and I. A. Bittencourt are recipients of CAPES and CNPq scholarships, respectively.

References

- Andrade Filho, J.D.A., Galati, E.A.B., Falcão, A.L. 2004. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 1059-1065.
- Andrade Filho, J.D.A., Galati, E.A.B., Falcão, A.L. 2007 *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102, 481-487.
- Balbino V.Q., Coutinho-Abreu I.V., Sonoda I.V., Silva, W.M., Marcondes C.B. 2005. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic forest in Recife, Pernambuco

- state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, 683-693.
- Bidlingmayer, W.L. 1969. The use of logarithms in analyzing trap collections. *Mosquito News* 29, 635-640.
- Casanova, C., Mayo, R.C., Rangel, O., Mascarini, L.M., Pignatti, M.G., Galati, E.A.B., Gomes, A.C. 1995. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of Mogi-Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Bol. Dir. Malar. San. Amb.* 35(suppl.), 363-375.
- Castro, E.A., Luz, E., Telles, F.Q., Pandey, A., Biseto, A., Dinaiski, M., Sbalqueiro, I., Soccol, V.T. 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* 93, 141-149.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besanky, N.J., Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 37-41.
- Cordoba-Lanus, 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.
- Falqueto, A., Ferreira, A.L. 2005. Reservatórios extra-humanos do complexo *Leishmania* e dinâmica da transmissão da infecção ao homem. Chapter 55. pp. 739-752. In: Coura, J.R. (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 2025p. **To the Editor: please, check this.**
- Galati, E.A.B. 2003. Morfologia e taxonomia. Classificação de Phlebotominae. Chapter 2.1. pp. 23-51. In: Rangel, E.R., Lainson, R. (org.) *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 367 p. **To the Editor: please, check this.**
- Gomes, A.C., Santos, J. L. F., Galati, E.A.B. 1982. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. *Revta. Saúde Públ.* 20, 280-287.

- Grisard, E., Steindel, M., Shaw, J.J., Ishikawa, E.A.Y., Carvalho-Pinto, C.J., Eger-Mangrich, I., Toma, H.K., Lima, J.H., Romanha, A.J., Campbell, D.A. 2000. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop.* 74, 89-93.
- Marcondes, C.B. 1996. A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 457-462.
- Marcondes, C.B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Entomol. News* – accepted.
- Marcondes, C.B., Conceição, M.B., Portes, M.G., 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). *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 353-355.
- Marcondes, C.B., Day, J.R., Ready, P.D. 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 725-726.
- Marcondes, C.B., Lozovei, A.L., Vilela, J.H. 1998. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz, Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). *Revta. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 51-58.
- Peixoto, A.A., Gomes, C.A., Amoretty, P.R., Lins, R.M.M.A., Meireles-Filho, A.C.A., Souza, N.A., Kyriacou, C.P. 2001. New molecular markers for phlebotomine sand flies. *Intern. J. Parasitol.* 31, 635–639.
- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Bertho, A.L., Britto, C.F.B. 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.
- Rangel, E.F., Barbosa, A.F., Andrade, C.A., Souza, N.A., Wermelinger, E.D. 1992. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva,

- 1912) (Diptera: Psychodidae: P.) under experimental conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87, 235-238.
- Rangel, E.F., Souza, N.A., Wermelinger, E.D., Barbosa, A.F. 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (sic), em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 395-396.
- Salomón, O.D., Estani, S.S., Dri, L., Donnet, M., Galarza, R., Recalde, H., Tijera, A. 2002. Leishmaniosis tegumentaria en Las Lomitas, Provincia de Formosa, Argentina, 1992-2001. Medicina (Buenos Aires) 62, 562-568.
- Salomón, O.D., Wilson, M.L., Munstermann, L.E., Travi, B.L. 2004. Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. J. Med. Entomol. 41, 33-39.
- Silva, A.C., Gomes, A.C. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911. Revta. Soc. Bras. Med. Trop. 34, 187-191.
- Silva, O.S., Grunewald, J. 1999. Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 579-582.
- Silveira, T.G.V., Teodoro, U., Lonardoni, M.V.C., Guilherme, A.L.F.; Toledo, M.J.O., Ramos, M., Arraes, S.M.A.A., Bertolini, D.A., Spinosa, R.P., Barbosa, O.P. 1996. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. Revta. Saúde Públ. 12, 37-45.
- 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. Revta. Saúde Públ. 40, 327-330.
- Volpini, A.C., Passos, V.M.A., Oliveira, G.C., Romanha, A.J. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica, 90, 31-37.

Legend to figures:

Figure 1: Map showing the sand flies capture sites (1-4) at the Piçarras Municipality, Santa Catarina State (SC), Brazil, as well as the localization of the Piçarras City (star) and the BR-101 Highway.

Figure 2: Panel A = 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide showing PCR amplification of *Leishmania braziliensis* DNA in field captured sand flies. MW = molecular weight marker (pUC 18 *Hae*III digested); lanes 1- 9 = *Nyssomyia neivai* samples; lane 10 = *L. amazonensis* (579); lane 11 = *Ny. neivai* + *L. braziliensis*; lane 12 = *L. braziliensis* (L2904); Lane 13 = no DNA (Negative control); lane 14 = sand fly DNA. Panel B = Hybridization with *L. braziliensis* probe and Panel C= Hybridization with *L. amazonensis* probe.