

TESE DE DOUTORADO:

**AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL DE
FLEBOTOMÍNEOS(DÍPTERA: PSYCHODIDAE) POR
LEISHMANIA SPP. EMPREGANDO ENSAIOS DE PCR
MULTIPLEX E PCR EM TEMPO REAL**

ALUNA

DANIELA DE PITA PEREIRA

ORIENTADORES

DRA. CONSTANÇA FELICIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO

DR. REGINALDO PEÇANHA BRAZIL



LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E DOENÇAS ENDÊMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

2010

DANIELA DE PITA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL DE
FLEBOTOMÍNEOS POR *LEISHMANIA SPP.* (DÍPTERA:
PSYCHODIDAE) EMPREGANDO ENSAIOS DE PCR
MULTIPLEX E PCR EM TEMPO REAL**

Tese apresentada como requisito
para obtenção do grau de
Doutor em Biologia Parasitário
do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

JUNHO/2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436

Pereira, Daniela de Pita

Avaliação de infecção natural de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania SPP.* empregando ensaios de PCR multiplex e PCR em tempo real / Daniela de Pita Pereira. – Rio de Janeiro, 2010.

xviii, 159 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 102-132

1. Lutzomyia. 2. Leishmania. 3. Diagnóstico molecular. 4. PCR. I. Título.

CDD 595.772

**AVALIAÇÃO DE INFECCÃO NATURAL DE
FLEBOTOMÍNEOS POR *LEISHMANIA SPP.* (DÍPTERA:
PSYCHODIDAE) EMPREGANDO ENSAIOS DE PCR
MULTIPLEX E PCR EM TEMPO REAL**

DANIELA DE PITA PEREIRA

TESE APROVADA EM:

BANCA EXAMINADORA:

DRA ELIZABETH FERREIRA RANGEL

DR ALEXANDRE AFRÂNIO PEIXOTO

DR JEFFREY JON SHAW

DR ADEÍLTON BRANDÃO

DRA. NATALY DE SOUZA

Dedico esta tese à:

André Luiz (in memoriam)

Meus pais Alcides e Laura

*Meu marido Leonardo e minha querida
filha Laura*

AGRADECIMENTOS

“A TODOS QUE ATUARAM DE FORMA DIRETA OU INDIRETA EM TODO O PROCESSO, O MEU MUITO OBRIGADA”

DEUS

MEUS ORIENTADORES: CONSTANÇA E REGINALDO

AOS MEMBROS DA BANCA:
DR. ADEÍLTON BRANDÃO,
DR. ALEXANDRE PEIXOTO,
DRA. ELIZABETH RANGEL
DR. JEFFREY JON SHAW
DRA. NATALY ARAÚJO DE SOUZA

CARLOS ROBERTO ALVES

MARIA ANGELICA

LUZIA

MINHAS ALUNAS :
THAÍS, LARISSA, CRISTIANE E LÍVIA REIS

MEUS COLABORADORES NESTA TESE:
DRA. ELIZABETH RANGEL
RACHEL LINS
DR. MARCOS BARBOSA (ENSP)

AOS MEUS AMIGOS DO LABORATÓRIO:
CLAUDIA, JOSÉ BATISTA, OTACÍLIO, FRANKLIN, CHICO, BERNARDO, LEO, CAMILA, ANDRÉ,
CAROL, CLARA, MILENA, MARIANA, BIANCA, ELLEN, LIVIA SANTOS, LIVIA UEHARA, SHEILA,
VITOR, RAQUEL, LENILDO.

A PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA:
DRA. ANA GASPAR E TODA COORDENAÇÃO
KATIA E LUCIANE

Ao CNPQ, FAPERJ E CAPES

A MINHA FAMÍLIA:
LEONARDO E LAURA

RESUMO

No presente estudo, a metodologia de PCR multiplex seguida de hibridização não radioativa direcionada para a região conservada dos minicírculos do kDNA (gênero *Leishmania*) e para o gene constitutivo *cacophony* de flebotomíneo (gênero *Lutzomyia*) foi inicialmente empregada para a avaliação da taxa de infecção natural em flebotomíneos provenientes de diferentes áreas endêmicas de LT e LV do Brasil, as quais apresentam diferentes graus de endemicidade e transmissão para uma ou outra forma da doença. Para a determinação do índice de infecção natural, considerou-se o mínimo de 1 (um) inseto infectado em cada *pool* positivo. Em Saquarema, foram constituídos *pools* de *Lu. intermedia* (13♂ / 30 ♀) e *Lu. migonei* (0♂ / 3♀), sendo que nenhum grupo de fêmea foi positivo para infecção por *Leishmania* spp. O mesmo ocorreu em Além Paraíba e Rio Bonito, onde foram coletados exemplares apenas de *Lu. intermedia*, totalizando a formação de *pools* consistindo de 11♂ / 30♀ e 8♂ / 27♀, respectivamente. No município do Rio de Janeiro foram constituídos *pools* de *Lu. intermedia* (27♂ / 32♀), onde 5/32 (15,6%) grupos de fêmeas foram positivos (dois da localidade Pau da Fome e três de Colônia Juliano Moreira), e *Lu. migonei* (8♂ / 5♀) com 3/5 (60%) *pools* de fêmeas positivos (um de Colônia J Moreira e 2 de Pau da Fome). Os ensaios de hibridização confirmaram infecção por *L. (V.) braziliensis* nos 8/37 *pools* positivos, indicando um índice mínimo de infecção natural de cerca de 2% nos flebotomos avaliados. Em Porto Alegre também foram obtidos resultados positivos para infecção por *L. (V.) braziliensis* em 3/98 (3,1%) grupos de fêmeas de *Lu. neivai* e 2/52 correspondentes à *Lu. fischerii* (3,8%), representando um índice mínimo de infecção natural de cerca de 0,3% para as duas espécies de flebotomos. Não foram obtidos resultados positivos para os *pools* de fêmeas de *Lu. migonei* (n=28) e *Lu. lanei* (n=2) coletados na região. Os resultados de Porto Alegre permitiram confirmar estudos prévios que sugeriram *Lu. neivai* como principal vetor de LTA no município. Em Corumbá foram formados *pools* para as espécies *Lu. cruzi* (12♂ / 13♀) e *Lu. forattinii* (6♂ / 14♀). Nesse município identificamos infecção por *L. infantum chagasi* em 2/13 (15,4%) amostras de fêmeas de *Lu. cruzi* e em 1/14 (7,1%) de *Lu. forattinii*, representando um índice total de infecção natural de 1,1 % (3/27). Os dados obtidos em Corumbá reafirmaram a importância de *Lu. cruzi* como principal espécie vetora de LV no município, além de sugerir o papel de *Lu. forattinii* como segunda espécie transmissora da doença nesta região. Visando o estudo da estimativa da carga parasitária nos *pools* de fêmeas que foram positivos pelos ensaios de PCR multiplex-hibridização, padronizamos a metodologia de PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção SYBR Green (para os dois alvos separadamente – *cacophony* e kDNA), o qual nos permitiu detectar, quantificar e também diferenciar os parasitos no nível de subgênero, através da curva de dissociação dos produtos amplificados do kDNA. Em relação às amostras provenientes de Corumbá, os *pools* positivos apresentaram uma quantificação de cerca de 100 parasitos/pool (2 de *Lu. cruzi* e 1 de *Lu. forattinii*). Além desses, dois novos *pools* de *Lu. forattinii* foram positivos, com cerca de 10 e 1 parasitos cada. Em Porto Alegre, dos 5 *pools* positivos pela PCR multiplex, 3 foram quantificados com cerca de 100 parasitos (2 *Lu. neivai* e 1 *Lu. fischerii*), os outros 2 apresentaram uma média de 10 parasitos (1 *Lu. neivai* e 1 *Lu. fischerii*). As amostras coletadas no Rio de Janeiro apresentaram uma quantidade média de 10 parasitos cada (4 de *Lu. intermedia* e 3 de *Lu. migonei*), sendo que um *pool* de *Lu. intermedia* positivo pelo diagnóstico qualitativo não pôde ser avaliado quantitativamente. A análise das curvas de dissociação para a determinação dos valores de Tm dos produtos amplificados do kDNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, corroboraram os resultados prévios de diagnóstico pelos ensaios de PCR multiplex-hibridização. Investigações diagnósticas que possibilitem a detecção, correta identificação e quantificação de carga parasitária por *Leishmania* spp na fauna flebotomínea em áreas com notificações de LTA e/ou LVA em humanos ou reservatórios animais, certamente contribuem para uma maior visão do quadro de veiculação das espécies de parasitos nas distintas áreas, fornecendo dados importantes para a compreensão da eco-epidemiologia dessas doenças nas respectivas áreas.

ABSTRACT

In this study, the multiplex PCR methodology was initially established with the purpose of assessing the natural infection rate in sand flies from different endemic areas of CL and VL in Brazil, which consist of various degrees of endemicity and transmission to all the forms of the disease. It is followed by non-radioactive hybridization, focused on the conserved area of kDNA minicircle (*Leishmania*) and the constitutive gene cacophony of sand fly (*Lutzomyia* genus). To determine the rate of natural infection, it was considered a minimum of one (1) infected insect to each positive pool. In Saquarema, pools of *Lu. intermedia* (13 ♂ / 30 ♀) and *Lu. migonei* (0 ♂ / ♀ 3) were identified and no female groups were positive for infection with *Leishmania* spp. It also occurred in Além Paraíba and Rio Bonito, where there were only collected specimens of *Lu. intermedia*, leading to the establishment of pools, comprising of 11 ♂ / 30 ♀ and 8 ♂ / 27 ♀, respectively. In the district of Rio de Janeiro there were pools of *Lu. intermedia* (27 ♂ / 32 ♀), in which 5 / 32 (15.6%) females groups were positive (two from Pau da Fome and three from Colonia Juliano Moreira), as well as 3 / 5 (60%) positive females pools of *Lu. migonei* (8 ♂ / ♀ 5) (one of them from Colonia Juliano Moreira and the other two from Pau da Fome). Hybridization tests have confirmed the infection by *L. (V.) braziliensis* in 8 / 37 of the positive pools, indicating a minimum rate of natural infection of approximately 2% of the evaluated sand flies. In Porto Alegre, positive results were also obtained for infection by *L. (V.) braziliensis* in 3 / 98 (3.1%) females groups of *Lu. neivai* and 2 / 52 corresponding to *Lu. fischerii* (3.8%), representing a minimum rate of natural infection of approximately 0.3% for the two species of sand flies. No positive results were obtained for females pools of *Lu. migonei* (n = 28) and *Lu. lanei* (n = 2) which were collected in the area. The results from Porto Alegre helped to confirm previous studies suggesting *Lu. neivai* as the district's main vector of leishmaniasis. In Corumbá, there were obtained pools for the species *Lu. cruzi* (12 ♂ / 13 ♀) and *Lu. forattinii* (6 ♂ / 14 ♀). We identified an infection by *L. infantum chagasi* in 2 / 13 (15.4%) samples from females of *Lu. cruzi* and 1 / 14 (7.1%) females of *Lu. forattinii*, representing a total rate of natural infection of 1.1% (3 / 27). The obtained data in Corumbá reassured the importance of *Lu. cruzi* as the district's VL main vector species and also suggested the role of *Lu. forattinii* as the second disease transmitter species in this area. Aiming at the estimate study of parasite load in positive females pools, according to multiplex PCR-hybridization, we standardized the real-time PCR methodology, using SYBR Green detection system (for both targets individually - cacophony and kDNA), which allowed us to detect, quantify and differentiate the level of parasites in the subgenus by means of kDNA amplified products dissociation curve. Regarding Corumbá's samples, the positive pools showed an amount of approximately 100 worms / pool (2 *Lu. cruzi* and 1 *Lu. forattinii*). Furthermore, two new *Lu. forattinii* pools were positive approximately with 10 and 1 parasite respectively. In Porto Alegre, from a total of 5 positive pools, 3 of them were identified according to multiplex PCR in approximately 100 parasites (2 *Lu. neivai* and 1 *Lu. fischerii*) and the other 2 had an average of 10 parasites (1 *Lu. neivai* 1 and *Lu. fischerii*). The samples collected in Rio de Janeiro had an average amount of 10 parasites each (4 *Lu. Intermedia* and 3 *Lu migonei*). One of them, which was positive according to qualitative diagnosis, could not be quantitatively evaluated. The analysis of dissociation curves for determining the Tm values of kDNA amplified products of promastigotes of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* corroborated the previous results of diagnostic testing by means of PCR multiplex hybridization. Thus, it is important to highlight that diagnostic investigations will certainly contribute to a greater view of the scope of the establishment of parasite species in different areas, providing important data for the understanding of the eco-epidemiology of these diseases. This process allows the detection, proper identification and quantification of parasite burden in *Leishmania* spp sand fly fauna in areas reporting ACT and / or AVL in humans or animal reservoirs.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2	PARASITOS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	3
1.2.1	Ciclo Biológico	5
1.2.2	O genoma de <i>Leishmania</i> spp	8
1.3	HOSPEDEIROS VERTEBRADOS DOS PARASITOS CAUSADORES DAS LEISHMANIOSES	11
1.4	HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS DA SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE	12
1.5	AS FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES.....	16
1.6	A LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA) NO BRASIL	18
1.6.1	Situação da LVA no Estado do Mato Grosso do Sul	19
1.7	A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NO BRASIL	20
1.7.1	Situação da LTA na Região Sudeste: Rio de Janeiro	21
1.7.2	Situação da LTA na Região Sul	23
1.8	DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO NATURAL DE FLEBÓTOMOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP	25
1.8.1	Métodos para a detecção de <i>Leishmania</i> spp em insetos flebotomíneos .	26
1.8.2	Contribuição da metodologia de PCR para a identificação de novas espécies de vetores.....	31
1.8.3	Diagnóstico molecular pela PCR: alvos utilizados.....	35
1.8.4	Considerações finais	36
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44

4.1 CULTIVO DE CÉLULAS	44
4.2 Obtenção de diferentes concentrações de parasitos para os ensaios com amostras reconstituídas	44
4.3 Seleção das áreas endêmicas para as coletas de flebotomíneos	45
4.3.1 Município do Rio de Janeiro (RJ)	45
4.3.2 Município de Saquarema (RJ).....	45
4.3.3 Município de Rio Bonito (RJ).....	45
4.3.4 Município de Além Paraíba (MG)	46
4.3.5 Município de Corumbá (MS).....	46
4.3.6 Município de Porto Alegre (RS).....	46
4.4 CAPTURAS DE FLEBÓTOMOS E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA	47
4.5 OBTENÇÃO DE LISADO DE FLEBÓTOMOS	48
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	48
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – <i>HOT-START</i> PCR MULTIPLEX	50
4.8 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	51
4.8.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	51
4.8.2 <i>DOT-BLOT</i> HIBRIDIZAÇÃO	51
4.9 PCR EM TEMPO REAL (SISTEMA SYBR <i>GREEN</i>).....	52
4.9.1 ESTABELECIMENTO DA CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO	54
4.10 ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE kDNA DAS DIFERENTES CEPAS ESTUDADAS.....	55
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Fase I	57

5.2 FASE II	60
5.2.1 ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	60
5.2.2 DETECÇÃO DE <i>L. (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> EM FLEBÓTOMOS COLETADOS EM ÁREAS ENDÊMICAS DE LTA DO RIO DE JANEIRO	61
5.2.3 ENCONTRO DE ESPÉCIMES DE <i>LU. (N) NEIVAI</i> E <i>LU. FISCHERI</i> NATURALMENTE INFECTADOS	63
5.2.4 DETECÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL POR <i>L. INFANTUN CHAGASI</i> EM <i>LU. CRUZI</i> E <i>LU. FORATINII</i>.....	64
5.3 FASE III	65
5.3.1 ETAPAS DE PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL	66
5.3.1.1 OTIMIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO	66
5.3.1.2 OTIMIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO	67
5.3.1.3 ANÁLISE DAS CURVAS PADRÃO DE CALIBRAÇÃO	71
5.3.1.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO SISTEMA POWER SYBR GREEN: ANÁLISE DAS CURVAS DE DISSOCIAÇÃO	72
5.3.1.5 SEQUENCIAMENTO DOS <i>AMPLICONS</i> CORRESPONDENTES À REGIÃO CONSERVADA DOS MINICÍRCULOS DO <i>KDNA</i> DE <i>LEISHMANIA SPP</i>	74
5.3.2 VALIDAÇÃO DO SISTEMA DE PCR POWER SYBR GREEN PARA ESTIMATIVA DA CARGA PARASITÁRIA DE FLEBÓTOMOS	76
5.3.2.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CORUMBÁ	77
5.3.2.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PORTO ALEGRE	80
5.3.2.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO	83

5.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS QUANTITATIVOS DE PCR EM TEMPO REAL ...	86
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÕES	105
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9 ANEXO: ARTIGOS PUBLICADOS.....	134

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	8
Figura 2: Armadilha utilizada na coleta dos flebótomos. Armadilha luminosa do tipo CDC. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Marcos S. Barbosa (DCB/ENSP/FIOCRUZ).	48
Figura 3: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação.....	50
Figura 4. Detecção de <i>L. infantum chagasi</i> em <i>Lu. cruzi</i> e <i>Lu. forattinii</i> coletados no município de Corumbá.....	65
Figura 5: Curvas padrão de calibração utilizando DNA extraído de amostras reconstituídas contendo diferentes concentrações de <i>L.(V.)braziliensis</i> e <i>L.(L.) chagasi</i> (10^3 - 10^{-2} células) adicionadas a um pool de 10 insetos machos. No eixo X está representado o número de parasitos equivalente a cada diluição, em Y os valores de Ct (número de ciclos).	72
Figura 6: Curvas de dissociação dos produtos amplificados de <i>L. (V.) braziliensis</i> (esquerda) e <i>L. (L.) chagasi</i> (direita), com os respectivos valores de Tm. Na abcissa está indicada a variação de temperatura e na ordenada a derivativa de fluorescência	73
Figura 7: Curvas de dissociação dos produtos amplificados de <i>L. (V.) shawi</i> e isolados de pacientes LT (esquerda) e <i>L. (L.) amazonensis</i> e isolados de pacientes LV (direita), com os respectivos valores de Tm. Na abcissa está indicada a variação de temperatura e na ordenada a derivativa de fluorescência	74
Figura 8: Alinhamento das 12 seqüências obtidas referentes às quatro espécies de <i>Leishmania</i> estudadas, utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor. As seqüências dos iniciadores nas extremidades 5' e 3' não estão demonstradas.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> encontradas no Brasil e seus vetores	15
Tabela 2: Descrição das diferentes formas da doença e manifestações clínicas.....	17
Tabela 3: Otimização da reação de PCR em tempo real utilizando os dois sistemas de detecção (Power e SYBR green).....	53
Tabela 4: Consolidado total de espécimes de flebotomos enviado para o diagnóstico molecular, separados por área, sexo e espécie	59
Tabela 5: Resultados da análise por PCR multiplex e hibridização dos pools de dez flebotomos fêmeas capturados em áreas de baixa endemicidade para LTA.	61
Tabela 6: Resultados da análise por PCR multiplex e hibridização dos pools de dez flebotomos fêmeas coletados em áreas de média endemicidade para LTA no município do Rio de Janeiro.....	62
Tabela 7: Resultados da análise por PCR multiplex e hibridização dos pools de dez flebotomos fêmeas capturados em área com notificações de LTA no município de Porto Alegre.	64
Tabela 8: Resultados da análise por PCR multiplex e hibridização dos pools de dez flebotomos fêmeas capturados em área endêmica para LVA no município de Corumbá.	65
Tabela 9: Comparação dos Cts obtidos a partir da amplificação de amostras de parasitos clonados (cell sorting) e diluição de parasitos.....	69
Tabela 10: Resultados obtidos com o ensaio de PCR em tempo real - sistema Power SYBR Green, a partir dos pools de dez flebotomos fêmeas (amostras diagnósticas) capturados em área endêmica para LVA no município de Corumbá. Os resultados estão expressos como média dos Cts em três experimentos independentes.	77
Tabela 11: Resultados obtidos com o ensaio de PCR em tempo real - sistema Power SYBR Green, a partir dos pools de dez flebotomos fêmeas (amostras diagnósticas) capturados em área com notificação de casos de LTA no município de Porto Alegre. Os	

Lista de Quadros

Quadro 1: Valores de Cts obtidos através da amplificação do gene constitutivo (*cacophony*) de flebótomos a partir de amostras de DNA total extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio equivalentes às diluições em série (10^3 a 10^{-2}) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* adicionadas a um *pool* de 10 insetos machos. Os valores estão expressos como médias dos Cts das duplicatas (*cacophony*) em três experimentos independentes para o sistema SYBR green e Power SYBR green.....68

Quadro 2: Valores de Cts obtidos através da amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, utilizando os sistemas de detecção Power SYBR green e SYBR green a partir das amostras de DNA extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio equivalentes às diluições em série (10^3 a 10^{-2}) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* adicionadas a um *pool* de 10 insetos machos. Os valores estão expressos como médias dos Cts das duplicatas (kDNA) em três experimentos independentes para cada protocolo de extração de DNA.69

1. Introdução

1.1. Considerações gerais.

As leishmanioses representam um grupo de doenças com ampla distribuição geográfica no Novo e Velho Mundo, e diversidade de formas clínicas, constituindo em importante problema de saúde pública mundial. As leishmanioses cutânea, mucocutânea e visceral correspondem às principais síndromes clínicas encontradas nos seres humanos. A importância destas reside não somente na sua alta incidência e extensa distribuição geográfica, com 12 milhões de indivíduos infectados nas regiões tropicais e temperadas do mundo (WHO 2009), mas também na possibilidade da doença assumir distintas manifestações clínico-patológicas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes (forma tegumentar: cutânea ou mucocutânea, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo) ou até mesmo levar a morte, (forma visceral, responsável pela maioria dos casos fatais) (Gontijo & Carvalho, 2003). Cerca de 350 milhões de pessoas no mundo estão sob o risco da infecção, e os registros indicam aproximadamente 2 milhões de casos novos notificados anualmente, dos quais 1,5 milhões incluem as formas tegumentares e 500 mil a forma visceral (WHO 2009). O risco em adquirir a doença visceral é maior nos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Desjeux et al., 1997; Desjeux et al., 1999, WHO, 2000).

Até então, a única via de infecção confirmada é através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas (Bates & Rogers 2004; Bates 2007). Assim, a distribuição geográfica das leishmanioses está associada à presença do inseto vetor, fêmeas hematófagas de espécies de flebotomos dos gêneros *Phlebotomus*, encontradas no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, presentes no Novo Mundo. Soma-se a isto uma série de características biológicas inerentes ao próprio vetor que certamente influencia em sua capacidade vetorial, podendo então exercer um impacto relativo na disseminação da doença, devido ao papel que estes desempenham na dispersão do parasito. A infecção por *Leishmania* spp ocorre em 88 países, localizados em quatro continentes (América, África, Europa e Ásia), porém, a notificação compulsória da doença ocorre em apenas 32 destes países (Desjeux et al 1999).

Atualmente, a leishmaniose já se estende até regiões do Pacífico, como Timor Leste, onde recentes relatos de casos supostamente autóctones foram reportados (Chevalier et al 2000). No continente Americano, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) são largamente disseminadas, estendendo-se do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e Chile (Gontijo & Carvalho, 2003).

No Brasil, ambas LTA e LVA se encontram em processo de expansão em quase todos os estados, com tendência à urbanização e registros ocasionais de surtos, constituindo um quadro endêmico com características próprias das questões de saúde pública (Lima et al., 2002; Ministério da Saúde, 2006). Em relação às duas formas da doença, sua ocorrência só é sobrepujada pela malária e doença de Chagas.

A *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* foi responsável por cerca de 3.500 casos autóctones da doença visceral, notificados a cada ano no Brasil (Ministério da Saúde/FUNASA, 1999, 2008). Sua maior incidência encontra-se no Nordeste, com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), a região Norte (3%) e a região Centro-Oeste (1%). Inicialmente de distribuição rural e pequenos centros urbanos, a LVA encontra-se em franca expansão para focos urbanos no Brasil (Evans et al., 1992; Marzochi & Marzochi, 1994; Sherlock, 1996; Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Por outro lado, mais de uma espécie de ambos os subgêneros *Viannia* - que inclui espécies do complexo *braziliensis*, e *Leishmania* - composto por aquelas do complexo *mexicana* (Thomaz-Soccol et al, 1993; Lainson & Shaw, 1998), podem causar as formas tegumentares no Brasil, com uma incidência de cerca de 35.000 casos por ano (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2007).

Mesmo os clínicos especializados em Medicina Tropical freqüentemente sentem-se confusos pela complexidade da doença tegumentar. Existem inúmeras combinações de diferentes síndromes, produzidas por espécies variadas. Assim, o diagnóstico diferencial é importante, pois outras doenças com sinais e sintomas similares (hanseníase, câncer de pele, esporotricose etc.), também podem ser endêmicas nas mesmas áreas. Em geral, o diagnóstico de leishmaniose é baseado, principalmente, na apresentação clínica e em dados

epidemiológicos. Porém não existe uma associação clara entre a clínica e a espécie de *Leishmania* infectante, logo, o diagnóstico é feito na maioria das vezes com base no tipo de lesão e no conhecimento da espécie presente na região onde se adquiriu a infecção. Estes dados podem ser confirmados pelo teste cutâneo de Montenegro, isolamento em cultura e pelo exame microscópico de esfregaço ou aspirado (de medula óssea ou baço) corados pelo Giemsa (Escobar et al., 1992).

Apesar da elevada prevalência mundial e os conhecimentos da relação entre o parasito e seu hospedeiro, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. A base do tratamento atual desta enfermidade foi descrita por Gaspar Viana em 1912, quando descobriu-se a ação curativa dos antimoniais sobre a doença cutânea. Somente na década de 40 foram introduzidos os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), como quimioterápicos, sendo atualmente as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. Na França e no Brasil emprega-se o Glucantime via intramuscular, enquanto na maioria dos outros países é utilizado Pentostan via endovenosa (WHO, 1990). Enquanto a vacina não se torna uma realidade, a combinação de quimioterapia, imunoterapia, imunoprofilaxia (Handman, 2001) e testes diagnósticos confiáveis pode ser ideal na batalha contra a doença.

Entre os fatores que contribuem para a ocorrência dos diferentes aspectos clínicos e epidemiológicos das leishmanioses, podemos citar as múltiplas espécies do parasito, do inseto vetor e reservatórios mamíferos envolvidos, assim como a diversidade dos ambientes habitados por esses organismos (Lainson e Shaw 2005). Ressalta-se também que registros de infecção natural de flebótomos em seus ecótopos ainda são escassos, ensejando desta forma novos estudos para a melhor compreensão da cadeia epidemiológica das diferentes formas da doença.

1.2. Parasitos do gênero *Leishmania*.

Os parasitos que causam as leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São organismos unicelulares, heteroxênicos, contendo uma organela especializada denominada cinetoplasto. Na natureza apresentam-se em duas formas distintas: promastigotas, encontradas no interior

do trato digestório dos hospedeiros invertebrados e amastigotas, obrigatoriamente intracelulares, que vivem e dividem-se dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (Peters & Killick-Kendrick, 1987). As formas amastigotas são constituídas por um corpo ovalado, ou arredondado, de 2 a 6 μm de diâmetro, contendo fundamentalmente um núcleo deslocado para a porção anterior acima do cinetoplasto, próximo ao qual encontra-se um flagelo interno inaparente. As promastigotas são de formas alongadas, com dimensões de 15 a 30 μm de comprimento por 2 a 3 μm de diâmetro, apresentando um núcleo central, um cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo longo e livre emergindo da bolsa flagelar na extremidade anterior (Lainson & Shaw, 1972; Molyneux & Killick-Kendrick, 1987; Pearson & Souza, 1996).

Aproximadamente 30 espécies de *Leishmania* foram identificadas até o momento, sendo 10 destas de significativa importância médica e veterinária (Bates & Ashford 2006; Lainson & Shaw 2006; Sakthianandeswaren et al., 2009). Desde a sua identificação inicial proposta por Ross em 1903, as espécies do gênero *Leishmania* passaram por vários tipos de classificações taxonômicas. Em 1987 foi proposta uma nova classificação baseada no padrão de colonização do tubo digestivo do vetor pelas formas promastigotas e no crescimento *in vitro* e *in vivo* (produção de lesões em animais de laboratório): 1) subgênero *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987) para designar a secção peripilária (formas promastigotas que se desenvolvem na porção posterior do intestino dos vetores, na região do piloro) e 2) subgênero *Leishmania* (Safjanova, 1982) para designar a suprapilária (formas promastigotas que se desenvolvem exclusivamente na porção média e anterior do intestino do flebótomo). Esta classificação se mantém atualmente e é corroborada pela análise de caracteres intrínsecos, bioquímicos e moleculares como, isoenzimas (Rioux et al 1990), seqüência do gene de mini-exon (Fernandes et al 1994), perfis de restrição (RFLP) dos espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor (SSU rRNA) (Noyes et al., 1997; Cupolillo et al., 2000), entre outros. Os parasitos de répteis foram agrupados em um novo gênero: *Sauroleishmania*, no Velho Mundo (Ranque, 1973; Killick-Kendrick et al., 1986).

O subgênero *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) é constituído por 7 espécies encontradas exclusivamente no Novo Mundo e que infectam o homem: *L. (V.) braziliensis*,

L.(V.) guyanensis, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L.(V.) lainsoni*, *L. (V.) naifi*, *L. (V.) shawi*, sendo as quatro primeiras as de maior importância médica.

O subgênero *Leishmania* (Saf'janova, 1982) contém 21 espécies, das quais 13 infectam humanos. No Velho Mundo as mais importantes são: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. No Novo Mundo sobressaem: *Leishmania infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. O emprego de ensaios moleculares permitiu concluir que *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são indistinguíveis bioquímica e antigenicamente, sendo atualmente consideradas o mesmo microrganismo (Tesh, 1995; Mauricio et al, 2000).

Estudos recentes baseados em aspectos bioquímicos e moleculares apontam claras relações filogenéticas entre tripanossomatídeos do gênero *Endotrypanum* - os quais parasitam hemácias de preguiças na forma tripomastigota ou epimastigota, mas também podem se desenvolver como promastigotas no intestino de flebótomos e em culturas *in vitro*, e algumas espécies de *Leishmania* que tinham classificação incerta, sugerindo assim, a criação de duas linhagens genéticas distintas: as "Seções" *Euleishmania* e *Paraleishmania*. A primeira compreende os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*; a segunda abriga o gênero *Endotrypanum* e as espécies, *Leishmania herreri*, *Leishmania deanei*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania equatorensis* e *Leishmania colombiensis* (Cupolillo et al., 2000; Cupolillo et al., 2001).

1.2.1. Ciclo biológico.

Embora a leishmaniose seja considerada geralmente como uma zoonose, sendo em grande parte restrita aos animais silvestres, o parasito também pode ser transmitido em um ciclo antroponótico (Garnham, 1971; Lainson, 1983). Este tipo de transmissão vem ocorrendo em áreas em países do Velho Mundo, onde o homem passa a ser um reservatório capaz de manter a doença em atividade. Com o desenvolvimento de regiões tradicionalmente rurais, levando à descrição da ocorrência do vetor e do parasito, este ciclo tem adotado um caráter antrozoonótico (Marzochi & Marzochi, 1994).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxênico obrigatório, alternando entre as formas promastigotas flageladas residentes no intestino do

inseto vetor e o estágio intracelular amastigota encontrado dentro de um fagolisossomo ativo de macrófagos do vertebrado. A maneira como os parasitos realizam essas transições durante o seu desenvolvimento, e os mecanismos que empregam para sobreviver no hospedeiro e resistir à gama de ambientes hostis que eles encontram, representam questões fundamentais para o controle desses patógenos.

No homem, promastigotas metacíclicos regurgitadas durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado (Killick-Kendrick, 1990), invadem células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), tais como monócitos e macrófagos.

Os parasitos são interiorizados pelo macrófago e encerrados num vacúolo – fagossoma; os fagossomas fundem-se com vesículas transportadoras de enzimas lisossomais originando os fagolisossomas (vacúolos parasitóforos), que são organelas com pH ácido, ricas em enzimas hidrolíticas e também possuem toda maquinaria bioquímica para síntese de agentes microbicidas, como espécies ativas do oxigênio e óxido nítrico (Antoine et al. 1990). As leishmanias sobrevivem nestas condições devido, por exemplo, ao lipofosfoglicano (LPG) que neutraliza os radicais livres e inibe a explosão respiratória pelo macrófago, pois interfere na cascata de ativação da proteína quinase C e na formação de 1,4,5 inositoltrifosfato do macrófago infectado. Outro exemplo que confere resistência aos parasitos no interior dos fagolisossomos é a presença dos fosfolipídeos de glicosil-inositol (GIPLs), cuja ação se faz sobre a inibição da explosão oxidativa e da síntese de ON, o que favorece a redução da atividade leishmanicida de macrófagos infectados (Mauel, 1996). Estas macromoléculas recobrem toda superfície dos parasitos e são sintetizadas em grande quantidade tanto por amastigotas quanto por promastigotas (Schneider et al, 1993).

A resistência do parasito aos baixos valores de pH do fagolisossoma acontece graças à presença de uma enzima de membrana, que funciona como uma bomba de prótons, bombeando prótons de dentro do vacúolo parasitóforo para o exterior (Zilberstein & Dwyer, 1988). No vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, que são metabolicamente mais ativas em pH ácido (Cazullo, 1992). As amastigotas, multiplicam-se por divisão binária no interior do fagolisossomas, o que causa o rompimento da célula infectada, liberando os parasitos no meio extracelular, os quais serão fagocitados por outros macrófagos, reiniciando os ciclos de multiplicação.

No momento em que a fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, alguns desses macrófagos parasitados são ingeridos e no tubo digestivo do flebótomo, os macrófagos se rompem e liberam as formas amastigotas que em seguida diferenciam-se em formas flageladas, promastigotas procíclicas precoces, que apresentam uma forma elíptica e possuem aproximadamente de 6 a 8 μm de comprimento (Walters, 1993; Handman, 2000). Com a desintegração da matriz peritrófica (MP) os parasitos aderem-se ao epitélio do intestino posterior ou médio onde continuam a se dividir rapidamente. A MP é uma camada acelular secretada por células que revestem o epitélio intestinal de um grande número de insetos hematófagos. Alguns autores creditam o escape dos promastigotas procíclicos do saco formado pela MP, à quitinases (endoglicosidases que degradam quitina) liberadas pelo próprio parasito (Schlein et al., 1990). Tanto o não escape da matriz quanto a não adesão à parede do epitélio fazem com que os parasitos sejam eliminados ao fim da digestão do sangue pelo inseto. Esta adesão dos promastigotas ao epitélio do tubo digestivo do flebótomo é proporcionada pelo LPG (Pimenta et al., 1994; Sacks et al., 1984; Saraiva et al., 1995; Butcher et al., 1996).

As formas promastigotas aderidas sofrem uma diferenciação (metaciclogênese) que promove uma modificação estrutural no LPG, o que permite aos parasitos se soltarem do epitélio. A seguir, os promastigotas metacíclicos (formas infectantes) migram para a região anterior do intestino médio onde se concentram na região da válvula estomodeal (cárdia) promovendo a destruição da mesma. Isso se dá em função da degradação de uma camada de quitina que reveste esta porção do intestino do inseto, pela liberação de quitinase, produzida pelo próprio parasito (Schlein et al., 1992). A destruição da válvula faz com que o inseto ao tentar sugar o sangue de um vertebrado durante a picada, regurgite uma parte do conteúdo intestinal que carrega os parasitos presentes na porção anterior do tubo digestivo (cárdia e probóscide), podendo infectar o hospedeiro vertebrado.

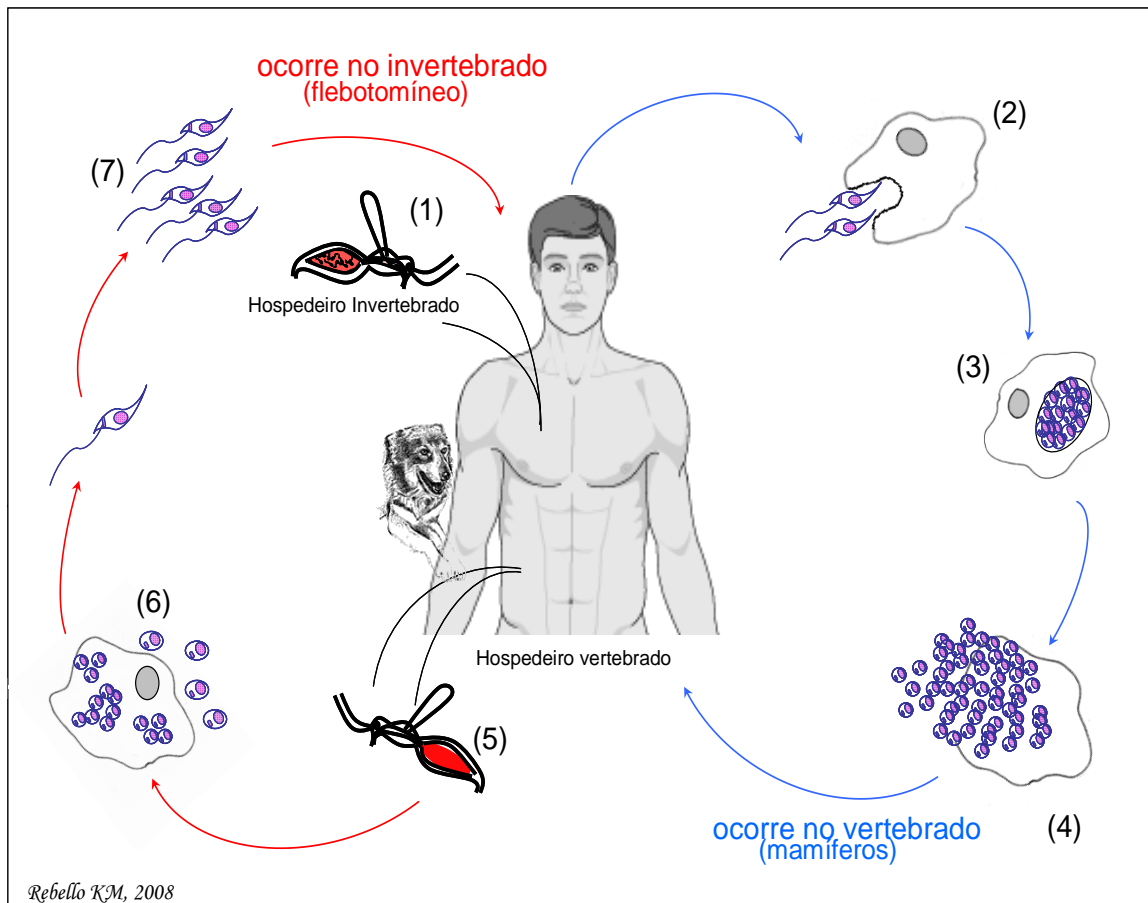


Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* (Imagem cedida por Karina Mastropasqua Rebello). No ciclo urbano e peri-urbano, as fêmeas infectadas por *Leishmania* podem transmitir as formas metacíclicas ao homem e animais domésticos (1). As formas promastigotas infectam células do sistema fagocítico mononuclear (2), e dentro dessas células sofrem metaciclo-gênese, transformando-se em amastigotas (3). As formas amastigotas se multiplicam intensamente causando o rompimento das células infectadas (4), ficando livres na corrente sanguínea para infectar novas células. Assim, quando um flebotomíneo faz o repasto sanguíneo no vertebrado infectado (5), ele ingere, juntamente com o sangue, células contendo as formas amastigotas do parasito (6), as quais irão se multiplicar e se diferenciar em promastigotas no trato digestório do díptero (7), migrando posteriormente para a probóscide do vetor.

1.2.2. O Genoma de *Leishmania* spp.

O genoma de *Leishmania* compreende cerca de 34 Mb com estimativa de codificar 10.000 genes (Blackwell & Melville 1999; Myler & Stuart 2000). A determinação completa da seqüência genômica de uma espécie protótipa – *Leishmania major* (Ivens et al., 2005), tem possibilitado a busca de genes de interesse para uma variedade de estudos, procurando assim obter um maior conhecimento dos genes que apresentam papéis

essenciais para a biologia do parasito. Este desafio tem levado os pesquisadores a um novo campo da ciência, denominado Genômica Funcional (Beverley et al., 2002). Nessa área, uma das estratégias utilizadas envolve a identificação de genes cuja expressão é alterada durante o crescimento ou desenvolvimento da *Leishmania*, ou em resposta à perturbações decorrentes de estímulos ambientais, efeito de drogas ou mutações genéticas. É sabido que em *Leishmania* e tripanossomos, a regulação gênica pode ocorrer em ambos os níveis de mRNA e proteínas (Graham, 1995). Nesses organismos a transcrição é policistrônica e requer o evento de *trans-splicing* para gerar os mRNAs monocistrônicos maduros (Ullu et al., 1996).

O genoma de parasitos da ordem Kinetoplastida consiste de dois tipos de ácido desoxirribonucléico (DNA) de replicação autônoma: DNA nuclear e DNA mitocondrial referido como DNA do cinetoplasto (kDNA). A análise de seqüências repetitivas do genoma nuclear e mitocondrial tem mostrado grande heterogeneidade, caracterizando-as como alvos específicos para tipagem e identificação precisa de organismos distintos (Barker, 1987; Simpson, 1987). O gene de mini-exon representa uma dessas seqüências repetitivas presentes no núcleo, que tem permitido a distinção entre gêneros e espécies dos Kinetoplastida (Fernandes et al., 1994). Outro gene que se encontra em múltiplas cópias no genoma, e que tem sido útil em ensaios de tipagem molecular do gênero *Leishmania*, é o gene codificante para RNA ribossômico. Cupolillo et al. (1995) relataram o potencial de regiões espaçadoras transcritas deste gene em experimentos de caracterização molecular, conseguindo definir as distintas espécies do subgênero *Viannia*.

O kDNA representa a informação genética mitocondrial dos cinetoplastídeos e corresponde a 10 - 20% do DNA total da célula. Consiste em uma rede compacta, formada por dezenas de milhares de moléculas de DNA circular menores, chamadas de minicírculos que encontram-se concatenadas entre si, com tamanhos aproximados de 800 pares de base (pb), no gênero *Leishmania*, e estão localizadas na matriz mitocondrial, ou cinetoplasto (Simpson, 1987; Ray, 1987; Ryan 1988).

Os maxicírculos estão presentes em menor número na rede de kDNA, com cerca de 50 cópias, com tamanhos variando de 20 a 37 kb, dependendo da espécie. Equivalem, geneticamente, ao DNA mitocondrial em outros eucariotos, e codificam para genes mitocondriais estruturais como citocromo B, subunidades de citocromo oxidase, subunidades

de NADH desidrogenases, todos envolvidos no processo de obtenção de energia celular. Os maxicírculos codificam também os genes de RNAs ribossomais da mitocôndria, 9S e 12S, além de outras fases abertas de leitura (Simpson & Simpson, 1978; De La Cruz et al., 1984; Shapiro & Englund, 1995).

Os minicírculos, na maioria das espécies de tripanosomatídeos, perfazem aproximadamente 90-95% da massa do kDNA (Englund, 1982). A função genética crucial dos minicírculos é codificar pequenos RNAs guias que possuem aproximadamente 70 nucleotídeos, que têm como função governar a edição do RNA mitocondrial (Sturm & Simpson, 1990). Apesar da heterogeneidade existente entre as seqüências primárias dos minicírculos, algumas características de organização de seqüências são comuns a todos eles. Essas moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pb, razoavelmente homogêneas entre representantes do mesmo gênero (Simpson, 1987). Ray (1989), comparando as regiões conservadas dos minicírculos de oito espécies de tripanosomatídeos, demonstrou a existência de três blocos conservados de seqüência (CSBs), isso já havia sido descrito em *Trypanosoma cruzi* por Degraeve et al. (1988). O CSB-3, por exemplo, tem 12 pb (5'- GGGGTTGGTGTA- 3') e é denominado de seqüência universal ou canônica, correspondendo à origem de replicação de uma das fitas de DNA dos minicírculos. Além das regiões de seqüências conservadas, os minicírculos apresentam regiões altamente variáveis, cujo grau de heterogeneidade parece refletir o número de classes de RNAs necessário para edição dos transcritos mitocondriais (Simpson & Shaw, 1989; Shapiro & Englund, 1995).

Os minicírculos que fazem parte da rede do kDNA dos parasitos do gênero *Leishmania*, apresentam um tamanho aproximado de 800 pb, possuem em comum uma única região de seqüência conservada de mais ou menos 120pb e uma região altamente variável de 650 pb. Eles estão presentes em cerca de 10.000 cópias por rede de kDNA, em *Leishmania* spp. O fato dessas moléculas estarem presentes em múltiplas cópias no genoma mitocondrial, aliado a presença de uma região de seqüência conservada evolutivamente nas diferentes espécies do gênero *Leishmania*, as tornam um excelente alvo molecular para estudos diagnósticos, clínicos e epidemiológicos.

1.3. Hospedeiros vertebrados dos parasitos causadores das leishmanioses.

Segundo a OMS, para ser incriminada como hospedeiro reservatório, a população de animais deve ser numerosa, possuir hábitos gregários freqüentes, vida longa, intenso contato com o inseto vetor, infecção leve de curso longo e o parasito infectante deve ser identificado como sendo da mesma espécie daquela encontrada no homem (Ashford,1996).

Os reservatórios primários são responsáveis pela manutenção dos agentes infecciosos em circulação e estão basicamente representados pela classe Mammalia, notadamente as espécies incluídas nas ordens Rodentia, Canidea, Marsupialia e Primata (Ashford, 1996). Os canídeos podem ser relacionados com o ciclo domiciliar e peridomiciliar (Lainson et al., 1994; Saliba & Oumeish 1999), embora os canídeos silvestres sejam classicamente descritos como reservatórios da *Leishmania infantum chagasi* (Deane & Deane, 1962).

Em relação à Leishmaniose Visceral, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório animal, devido ao intenso parasitismo cutâneo, apesar dos cães poderem apresentar infecção assintomática, além da sua proximidade de contato com humanos (Madeira et al., 2004). O reconhecimento das manifestações clínicas no cão é de fundamental importância para a adoção das medidas de controle da doença. Entretanto, o tratamento de cães infectados não tem se mostrado como uma estratégia efetiva para tal, considerando que as reincidências são freqüentes e os cães rapidamente tornam-se infectados novamente (Alvar et al., 1994). Por outro lado, as raposas (*Dusycion vetulus* e *Cerdocyon thous*) e outros animais selvagens, como por exemplo, o marsupial (*Didelphis albiventris*), atuam na transmissão silvestre (Braga et al., 1986; Lainson et al., 1990).

Outros tipos de hospedeiros que exercem papel secundário como reservatórios incluem: o hospedeiro acidental e o hospedeiro de ligação. O hospedeiro acidental é irrelevante para a persistência da infecção, enquanto o hospedeiro de ligação traz a infecção para as proximidades do homem e facilita a sua transmissão (Ashford, 1996). Os primatas humanos são hospedeiros acidentais, podendo adquirir a doença quando penetram no foco zoonótico e são picados pela fêmea dos flebótomos (Lainson & Shaw, 1987), como ocorre em

áreas de assentamento rural, construção de estradas, novos projetos industriais e manobras militares.

Uma espécie de *Leishmania* pode ser mantida por diversos hospedeiros (homens, cães e roedores), e um mesmo hospedeiro pode albergar diferentes espécies de leishmanias (Saliba et al., 1988; Strelkova et al., 1993). Identificar os animais que podem servir de reservatório para as leishmanias, em uma área endêmica, tem grande relevância na epidemiologia das leishmanioses. A identificação de um animal como reservatório necessita ser provada e depende do isolamento do parasito de lesões de pele ou de víscera (Saliba & Oumeish, 1999). Métodos de laboratório (Imunoensaios, eletroforese de isoenzimas, sondas de DNA e a reação em cadeia da polimerase - PCR) têm papel essencial na identificação de espécies do parasito isoladas de animais e podem ser utilizados como importante ferramenta para identificação de novos reservatórios.

1.4. Hospedeiros invertebrados da subfamília Phlebotominae.

Os flebótomos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Young & Duncan 1994), com aproximadamente 700 espécies descritas até o momento (revisado por Bates 2007). A subfamília Phlebotominae está dividida em seis gêneros, três no Velho Mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, e três no Novo Mundo: *Lutzomyia* (França & Parrot, 1924), *Brumptomyia* (França & Parrot, 1921) e *Warileya* (Hertig, 1940). O gênero *Psychodopygus* (Mangabeira, 1941) tem sido aceito por alguns autores (Fraiha et al., 1971; Forattini 1973; Lainson et al., 1973; Fraiha & Ward 1974), contudo, manteve sua posição taxonômica como subgênero de *Lutzomyia* (Galati 2003).

No Velho Mundo, o gênero *Phlebotomus* é o mais importante relacionado às leishmanioses, enquanto que no Novo Mundo, as espécies mais relevantes são pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (revisado por Lainson & Shaw, 1987, 1992, 1998). Apesar da existência de cerca de 500 espécies de flebótomos descritas nas Américas, apenas cerca de 10% têm sido incriminadas como vetores de *Leishmania* (Galati et al., 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde, para que uma espécie seja considerada transmissora, cinco critérios devem ser cumpridos: alta densidade do flebótomo na área endêmica, seu grau de

antropofilia, a infecção natural por *Leishmania* spp, a comprovação experimental da infecção e a transmissão pela picada (WHO, 1990).

A hematofagia é característica apenas das fêmeas adultas, as quais apresentam um ciclo gonadotrófico fazendo cada ovoposição cerca de cinco a sete dias após o repasto sanguíneo. A alimentação sanguínea é necessária para que ocorra o amadurecimento do folículo ovariano e desenvolvimento dos ovos. Além disso, os flebótomos alimentam-se de seivas de plantas ou secreções de afídeos (*honeydew*) como fonte de carboidratos, dos quais obtêm energia para suas atividades fisiológicas, principalmente relacionadas ao vôo. (Forattini, 1973; Brazil & Brazil 2003).

Para se reproduzirem, os flebótomos põem ovos de maneira esparsa no substrato, onde ficam aderidos a uma substância viscosa, que é produto de secreção das glândulas acessórias. A média de incubação é de sete a quinze dias de acordo com a espécie.

O ciclo biológico desses insetos é composto por quatro estágios larvais. As larvas vivem em solo úmido ou rico em detritos orgânicos. A quarta larva migra para um solo ligeiramente mais seco para pupar. Tentativas feitas por Barreto em 1943, no sentido de descobrir criadouros naturais destes insetos, foram infrutíferas. Em outros estudos em ecótopos naturais, onde vivem milhares de adultos, poucas larvas foram encontradas. Exemplo da dificuldade do estudo de formas imaturas foi observado por Petrischeva & Izyumskaya (1941), que processaram nove toneladas de solo, compreendendo 965 amostras de solo, encontrando apenas 28 positivas. Herting (1942) desempilhou uma parede de rocha, onde frequentemente eram encontrados adultos, e apenas uma exúvia pupal foi encontrada. Essa dificuldade se deve ao fato, como já foi dito anteriormente, das fêmeas depositarem seus ovos de maneira esparsa em vários locais diferentes.

Após a evolução do estágio de pupa para adulto, o inseto vive cerca de 28 à 32 dias. Neste período a fêmea é capaz de realizar repastos sanguíneos, adquirindo o parasito no interior de macrófagos, se a fonte alimentar em questão estiver infectada. Os flebótomos possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia, embora possuam também hábitos matutinos e vespertinos no interior das matas (Forattini, 1973). Quanto à preferência alimentar, as espécies de flebótomos são também consideradas ecléticas. Muitas

espécies de *Lutzomyia* capturadas com isca humana sugam outros animais; *Lu. longipalpis* é o melhor exemplo, tendo a capacidade de picar o homem, o cão, as aves e outros animais com bastante avidez, no mesmo ecótopo. O aumento da população de *Lu. longipalpis*, com sua conseqüente expansão geográfica para áreas onde essa espécie nunca ou raramente pôde ser observada, poderia explicar o aparecimento de novos focos de leishmaniose visceral no país. Outras espécies com as mesmas características alimentares são: *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, e *Lu. fischeri* que, em ambientes antrópicos, adaptam-se aos abrigos de animais, invadindo os domicílios para sugar o homem (Gomes et al., 1982; Rangel et al., 1986; Brazil et al., 1991; Brazil & Brazil 2003). A preferência alimentar pode também variar em diferentes populações de uma mesma espécie, como é o caso da *Lu. withmani sensu lato*, que é zoofílica na região amazônica, todavia tem atração pelo homem no Nordeste e no Sudeste do país (Lainson, 1983; Azevedo & Rangel, 1991; Brazil, Morton & Ward, 1991).

A maioria das espécies de flebotomos é silvestre e ataca o homem e animais domésticos quando as habitações são próximas a mata, possuindo uma reduzida capacidade de vôo. Algumas são consideradas ecléticas quanto ao local de abrigo, e, devido à modificação do habitat, pelo homem, vão se adaptando ao peridomicílio e até mesmo tornam-se espécies domiciliadas. As espécies mais adaptadas aos ambientes que sofreram intensa ação antrópica e pouco ocorrem em ambientes silvestres são: *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* (Aguiar, et al., 1987). *Lu. intermedia* é considerada uma das primeiras espécies de flebotomos descritas na região neotropical, por Lutz & Neiva (1912), a partir de exemplares coletados na fazenda Ouro Fino, Além Paraíba, no estado de Minas Gerais. Encontrada nas cinco regiões do Brasil, é altamente antropofílica, sendo abundante no interior das residências, bem como nos ambientes peridomiciliares, inclusive em abrigos de animais domésticos (Brazil et al., 1991). Pode ser encontrada em floresta, porém são escassos os relatos em regiões marginais (Forattini, 1953). É o principal vetor envolvido na transmissão de *L. (V.) braziliensis* no Brasil (Aragão, 1922; Forattini et al., 1972; Rangel et al., 1984; Rangel & Lainson 2009). *Lu. migonei* foi descrita por França (1920), dotada de notável grau de antropofilia, com ampla distribuição na América do Sul. No Brasil possui ampla distribuição, sendo também capturada nas cinco regiões. Seus habitats mais comuns são: troncos e ocos de árvores, fendas em rochas, ambientes peridomiciliares (anexos de animais domésticos) e intradomiciliares. Incriminada

como transmissora de *L. (V.) braziliensis* na Venezuela e também no Brasil (Grimaldi Jr. & Tresh, 1993; Young & Duncan, 1994).

O Brasil representa o país com maior número de espécies de flebotomíneos, sendo um total de 229 espécies e subespécies de *Lutzomyia* distribuídas por todo o território brasileiro, entre as 470 espécies descritas no Novo Mundo (Galati, 2003); sem considerar que novas espécies de vetores ainda estão sendo encontradas e descritas no país nos últimos anos. Dentro do gênero *Lutzomyia*, o subgênero *Nyssomyia* é o de maior importância para a compreensão da epidemiologia da LTA (revisto por Rangel & Lainson 2009). A Tabela 1 mostra as principais espécies de flebotomos encontradas no Brasil, bem como a espécie de *Leishmania* que transmitem.

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil e seus vetores

<i>Leishmania</i> spp.	Vetor (<i>Lutzomyia</i> spp.)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. olmeca</i> , <i>reducta</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>whitmani</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. pessoai</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> , <i>Squamiventris</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>

1.5. As formas clínicas das leishmanioses.

Do ponto de vista clínico, as leishmanioses se dividem em dois grandes grupos: forma tegumentar e forma visceral. Em ambos os grupos, depois de estabelecida a infecção e de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, assim como a resposta imune do hospedeiro infectado, os eventos subseqüentes ocorrerão de forma variada (Person & Sousa, 1996) (ver Tabela 2). As espécies causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresentam um espectro de manifestações cutâneas. As principais espécies que causam a doença tegumentar humana no Brasil são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (Lainson & Shaw, 1972; Grimaldi Jr. & Tresh, 1993). De uma maneira geral o quadro de lesões pode variar de lesões únicas ulceradas ou nodulares, muitas vezes de evolução benigna (leishmaniose cutâneo-simples, LC), a casos de numerosas lesões disseminadas por todo o corpo do indivíduo ou lesões difusas levando a quadros graves (leishmaniose cutâneo-difusa, LCD), de difícil cura, ou ainda, a lesões mutilantes provocadas pelo parasitismo de mucosas (leishmaniose mucocutânea, LMC), (WHO, 1998). Tanto a forma cutânea como a mucocutânea respondem muito bem ao tratamento disponível, a base de antimoniais pentavalentes (como Glucantine e Pentamidina), porém a forma cutânea difusa quase sempre não responde a esse tratamento (Barreto et al., 1981).

A LC é a forma clínica mais freqüente, podendo estar associada a qualquer uma das espécies dermatrópicas citadas anteriormente. Entretanto, enquanto a *L. (V.) braziliensis* é conhecida pela sua capacidade em originar disseminação para mucosas, a *L. (V.) guyanensis* pode gerar lesões cutâneas múltiplas metastáticas e as infecções por *L. (L.) amazonensis*, podem se caracterizar como difusas ou serem responsáveis por formas mucosas (Barral et al., 1991).

Quanto às espécies relacionadas à Leishmaniose Visceral (LV), os parasitos multiplicam-se preliminarmente em macrófagos da pele, alcançando depois as células do SFM dos órgãos internos, principalmente baço, fígado e medula óssea, provocando quadros cuja severidade depende normalmente do tempo de evolução clínica, gerando desde quadros assintomáticos a moderados e graves, onde, observa-se hepato-esplenomegalia com comprometimentos generalizados, acarretando em casos fatais, quando não tratados (WHO, 1998). No tratamento desta forma, geralmente são utilizados antimoniais pentavalentes em

combinação com Anfotericina B e formulações lipossomais (Miltefosina) (Romero & Boelaert 2010).

Na Índia, o padrão de transmissão é totalmente diferente, onde a transmissão é antroponótica ao invés de zoonótica, tendo como agente causal *Lu. donovani*, e uma espécie diferente de flebótomo, o *Phlebotomus argentipes* (Romero & Boelaert 2010). Cerca de 20% dos pacientes desenvolvem “leishmaniose dérmica pós calazar” (LPK) 1 a 5 anos após cura aparente da forma visceral (Pearson & Souza, 1995; Herwaldt, 1999).

Tabela 2: Descrição das diferentes formas da doença e manifestações clínicas

Formas da Doença	Manifestações Clínicas
Cutânea (LC)	Lesão única ou múltiplas lesões que podem ser secas ou úmidas, crostosas ou nodulares, dependendo da espécie infectante. Pode ocorrer infecção secundária.
Mucocutânea (LMC)	Disseminação metastática do parasito para a mucosa orofaríngea a partir da úlcera cutânea. Perfuração do septum nasal. Pode causar desfiguração e complicações respiratórias.
Cutânea Difusa (LCD)	Muitas lesões difusas, papulares não ulceradas.
Visceral (LV)	Comprometimento do sistema reticulo-endotelial visceral (baço e fígado) apresentando febre, perda de peso e diarreia.
Pós-kalazar (LPK)	Lesões nodulares e despigmentação da pele.

Adaptado de Person & Sousa (1996)

1.6. Leishmaniose Visceral Americana no Brasil.

Na América Latina, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. Entre 1990 e 2006, o Brasil declarou um total de 50.060 casos clínicos de LVA, estando esse montante sujeito à sub-notificações substanciais (Ministério da Saúde 2008). Até poucos anos atrás, foram reportados no país 176 casos de co-infecção HIV/LVA (Rabello et al. 2003), contudo existe um número significativo de indivíduos assintomáticos co-infectados (de Gouvea-Vianna et al., 2008).

A LVA foi primeiramente identificada por Migone em 1913, no Paraguai, em um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Já os primeiros casos brasileiros relatados datam de 1934 nas regiões Norte e Nordeste, durante pesquisas de febre amarela, quando foram identificados 41 casos positivos para *Leishmania* diagnosticados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem* (Pena et al., 1934). A seguir, *Lu. longipalpis* foi incriminado como vetor e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães. Desde então, a doença vem sendo descrita em vários municípios. Até a década de 80 a doença tinha um caráter essencialmente rural, com 90% dos casos concentrados no Nordeste, considerada área de alta endemicidade, salientando os Estados de Ceará e Bahia. A partir de 1990, a LVA apresentou mudanças nos padrões epidemiológicos e sua transmissão vem ocorrendo em diversas cidades de todas as regiões do Brasil, exceto o Sul, em zonas rurais, periurbanas e urbanas de grandes centros, tais como: Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Corumbá, Três Lagoas e Campo Grande (MS), Palmas (TO) (Ministério da Saúde/SVS, 2007). Por exemplo, no Estado do Rio de Janeiro, até o ano de 2006, 87 casos autóctones de leishmaniose visceral foram diagnosticados, todos sendo de áreas periurbanas localizadas no lado oeste da cidade do Rio de Janeiro. Curiosamente, nenhum caso da doença foi notificado nos anos seguintes (revisto por Marzochi et al., 2009). De acordo com as normas do Ministério da Saúde, o município do Rio de Janeiro está classificado como área de transmissão esporádica de LVA (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005).

Esta recente urbanização da LVA tem sido ocasionada por uma série de fatores, como desmatamento, precariedade das condições sanitárias, migração maciça de áreas

endêmicas rurais, desnutrição, projetos de engenharia em grande escala (Desjeux 2001; Singenbergh *et al.*, 2004). Atualmente, a LVA está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação do Brasil, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (Ministério da Saúde/SVS, 2007).

Lu. longipalpis (Lutz & Neiva, 1912), por mais de 50 anos foi considerada a única espécie vetora de *L. (L.) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), por toda a extensão geográfica de Leishmaniose Visceral (Deane & Deane 1962; Lainson & Rangel 2005). Atualmente, já existem relatos na região Centro-Oeste do Brasil, do papel de *Lu. cruzi* (Mangabeira 1938), atuando como importante espécie vetorial de LVA, no município de Corumbá - Mato Grosso do Sul, área endêmica com aumento de notificações da doença em humanos e cães nas últimas duas décadas (Santos *et al.*, 1998; Pita-Pereira *et al.*, 2008). Nesse mesmo município, *Lu. forattini* foi considerada como possível vetor secundário (Pita-Pereira *et al.*, 2008).

1.6.1. Situação da LVA no Estado de Mato Grosso do Sul.

As Leishmanioses são atualmente um dos maiores problemas de saúde pública no Estado do Mato Grosso do Sul, sendo relatada desde 1911 com casos humanos esporádicos. Em relação à LVA, o número de notificações vem aumentando, e após 1998, a doença expandiu-se por outras regiões do Estado, que passaram a ser consideradas endêmicas (Arruda *et al.*, 1949; Arias *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2006), culminando em uma alta taxa de mortalidade, durante os anos de 1999-2004 nos municípios de Aquidauana, Campo Grande e Três Lagoas. Atualmente a LVA encontra-se disseminada por todo o Estado, com notificações em 49 municípios (SSMS 2006).

Na capital do Estado, Campo Grande, o primeiro caso canino autóctone foi notificado em 2000 (Silva *et al.*, 2000) e o primeiro caso humano, em 2002. Neste mesmo ano, mais 19 casos de LVA foram diagnosticados na cidade e, durante os anos de 2003 e 2004, 100 e 126 casos foram notificados, respectivamente. A presença de *Lu. longipalpis* na cidade, foi evidenciada por Oliveira *et. al* (2000) e a partir daí, mais estudos sobre a fauna flebotomínea foram feitos na área urbana e 28 espécies de flebotomíneos foram identificadas (Oliveira *et al.*, 2003).

O município de Corumbá no noroeste do Mato Grosso do Sul é considerado pelo Ministério da Saúde como uma área altamente endêmica, com transmissão ativa de LVA canina e humana. Embora essa área seja hiperendêmica e três machos de *Lu. longipalpis* tenham sido encontrados em 2001 (Santos et al., 2003), outros estudos entomológicos não demonstraram a presença dessa espécie no município (Galati et al. 1985, 1997; Brazil et al., 2002). Assim, o predomínio das espécies de flebotomíneos *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) e *Lu. forattinii* (Galati et al., 1985) e sua antropofilia sugeriram uma possível participação de ambas as espécies no ciclo da LVA, em Corumbá (Galati et al., 1997). Além disso, o primeiro achado de *Lu. cruzi* naturalmente infectado por *L. (L.) infantum chagasi* apoiou fortemente a sua identificação como espécie vetora da doença nesta região (Santos et al., 1998). Mais recentemente, durante o desenvolvimento deste projeto de Tese, demos suporte à hipótese de *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* atuarem na veiculação de LVA no município de Corumbá, através da identificação de infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, em exemplares de ambas as espécies coletados em áreas com registros de casos humanos e caninos de LVA nesta localidade (Pita-Pereira et al., 2008).

1.7. Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

Com diferentes características regionais, da Amazônia ao Sudeste do Brasil, a LTA apresenta aspectos diversos em relação à variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas - estando a maior diversidade desses parasitos localizada na região Amazônica, aos diferentes flebotomos envolvidos, possíveis reservatórios primários, hospedeiros acidentais, padrões de transmissão e perfis ecoepidemiológicos (Shaw & Lainson, 1987; Marzochi, 1992). *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) - *Lu. intermedia*, foi uma das primeiras espécies de flebotomos descrita na região Neotropical, no Estado de Minas Gerais, e hoje em dia é considerada como vetor principal na transmissão de *L. (V.) braziliensis* no Brasil (revisto por Rangel & Lainson 2009).

A LTA no Brasil não é um fato recente. Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *L. braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil (Vianna, 1912). Até o momento, seis espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA

humana: *L. (L.) amazonensis*; *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi* (Lainson et al., 1989); *L.(V.) naiffi*, (Lainson & Shaw, 1989) e *L. (V.) lainsoni* (Silveira et al., 1987). A primeira espécie é comum em florestas primitivas da região Norte do Brasil (Amazônica). A *L.(V) guyanensis*, ocorre também na região Amazônica, estendendo-se aos Estados do Amapá e Norte do Pará. As espécies *L.(V.) shawi*, *L. (V) naiffi* e a *L.(V) lainsoni*, foram registradas até o momento, somente no Estado do Pará (Lainson et al., 1994). A *L.(V) braziliensis* tem sido registrada, nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Lainson et al., 1994). Casos de infecções por *L. major* similares foram descritos em Minas Gerais (Momen et al., 1985; Hashiguchi et al., 1991), o que inclui a espécie no quadro da LTA.

A LTA associada à *L. (V.) braziliensis* apresentou nos últimos anos um processo de expansão em todas as regiões do Brasil, tanto nas áreas notoriamente endêmicas, como incidência em novas áreas, inclusive na periferia de grandes cidades do país, como Manaus, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, constituindo em importante problema de saúde pública (Marzochi, 1992; Grimaldi Jr & Tesh, 1993; Brandão-Filho & Shaw, 1994; Marzochi & Marzochi, 1994).

1.7.1. Situação da LTA na Região Sudeste: Estado do Rio de Janeiro.

Um jovem cientista do Instituto Oswaldo Cruz, Henrique Aragão (1922), pôde atribuir a uma espécie de flebótomo, *Lu. intermedia*, a transmissão de leishmaniose tegumentar nas Américas. Isso aconteceu apenas um ano após ter sido sugerida a transmissão desta doença no Velho Mundo, por flebátomos (Sergent et al., 1921). Aragão assinalou a associação entre a alta densidade dessa espécie de flebótomo e a presença da doença, na localidade de Águas Férreas, próxima às montanhas do Corcovado e localidade de Santa Teresa, na cidade do Rio de Janeiro. Dessa forma, *Lu. intermedia* foi incriminada como vetor potencial de *L. (V.) braziliensis*, ao produzir no focinho de um cão uma úlcera contendo formas amastigotas, conseqüente à inoculação de triturado de exemplares desses flebátomos infectados, os quais haviam sugado pessoas doentes.

A partir daí, diversos estudos relacionados à epidemiologia da LTA realizados em áreas endêmicas do Sudeste do Brasil, tais como São Paulo e Rio de Janeiro, vêm apontando *Lu. intermedia* como a de maior potencialidade vetorial para transmitir a doença em

ambientes domiciliares e peridomiciliares, devido a sua densidade, antropofilia e facilidade de adaptação a ambientes antrópicos (Souza et al., 1995; Carvalho et al., 1995; revisto por Rangel & Lainson 2009). Estas observações e a sucessão de relatos da presença combinada de *Lu. intermedia* e casos de LTA em diversos focos da doença em São Paulo e Rio de Janeiro, centraram atenção nesta espécie como vetor mais provável da doença (Forattini 1953; Forattini et al., 1976; Araújo Filho 1979; Gomes 1979; Rangel et al., 1990). Estudos sobre o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* em *Lu. intermedia* infectado experimentalmente forneceram maiores evidências (Rangel et al., 1992). Mais recentemente e com auxílio de abordagens moleculares de diagnóstico, um elo na cadeia de evidências da incriminação de *Lu. intermedia* como um vetor de LTA foi estabelecido, a partir da identificação de *L. (V.) braziliensis* presente nesta espécie de flebótomo, capturado em um foco da doença em Jacarepaguá (RJ) (Pita-Pereira et al., 2005).

Por outro lado, em Minas Gerais e Espírito Santo, este papel estaria sendo compartilhado com *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, um vetor de LTA confirmado tanto no peridomicílio, como em áreas de vegetação secundária (Falqueto 1995; Passos et al., 1993; Mayrink et al., 1979). Souza et al. (2003) também identificaram a presença de ambas, *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani*, em uma área de LTA no Rio de Janeiro e sugeriram que na localidade, as duas espécies poderiam estar envolvidas na transmissão da doença.

O primeiro caso autóctone de LTA no Estado do Rio de Janeiro foi registrado por Rabello em 1913. Em 1915, d'Utra-e-Silva referiu a ocorrência da doença nos bairros de Realengo, Jacarepaguá e Gávea. Em 1922, ocorreu uma epidemia na localidade de Águas Férreas, no Vale das Laranjeiras, nas proximidades das encostas dos morros do Corcovado e Santa Tereza (Cerqueira e Vasconcellos, 1922), que foi a primeira descrita em área urbana no país.

Durante uma epidemia de LTA na localidade de Jacarepaguá (RJ), em 1974, foram registrados 162 casos da doença, atingindo localidades situadas nas várzeas e encostas do maciço da Pedra Branca. Os levantamentos entomológicos mostraram que o flebótomo encontrado em maior frequência nesses focos foi *Lu. intermedia*, representando 92,7% dos animais capturados, seguido de *Lu. migonei* (6,8%) (Sabroza 1981).

Em 1979, Araújo Filho, estudando um surto da doença em Ilha Grande (RJ), sugeriu que *Lu. migonei* estaria compartilhando com *Lu. intermedia*, o papel de vetor da doença, pois foi encontrada em casas onde haviam casos clínicos de LTA ou intradermorreação positiva (teste de Montenegro). Rangel et al. (1986) descreveram, em Jacarepaguá, *Lu. migonei* ocorrendo em densidade considerável, destacando-se junto de *Lu. intermedia*, como espécie predominante. Entretanto, em outro foco de LTA no Rio de Janeiro, em Mesquita, *Lu. migonei* representou 15,8% da fauna local e, pôde ser considerado como vetor secundário na região. Isso pôde ser comprovado, recentemente, por Pita-Pereira et al. (2005), a partir do encontro de espécimes de *Lu. migonei* infectadas com *L. (V.) braziliensis* na região de Jacarepaguá.

Nos anos seguintes à epidemia de 1974 em Jacarepaguá, novos surtos epidêmicos de LTA atingiram outras localidades e bairros da cidade, estendendo às encostas e vertentes das baixadas de Campo Grande e Guaratiba. A partir de 1975, a maioria dos casos registrados ocorreu em Vargem Grande (15,5%). Entre 1978 e 1980, 18% dos casos ocorreram em Grumari e Piabas, e 24% em Pau da Fome. As localidades de Campo Grande, Rio da Prata, Cabuçu, Caboclos, Lameirão Pequeno e Viegas, contribuíram com índices expressivos da doença, durante o período de 1981 e 1984, somando juntas aproximadamente 27% dos casos notificados. Nesse mesmo período, Vargem Grande e Camorim, registraram em cada, aproximadamente 13% dos casos. Nos quatro anos posteriores, Vargem Grande registrou um expressivo percentual de casos (20,5%), seguida de Pau da Fome, Rio Grande e Rio Pequeno, que foram juntos, responsáveis por 20,8% dos doentes notificados neste período (Kawa, 2002).

Dados da Secretaria Estadual de Saúde reportam para o período 1985 – 2003 a notificação de 4.867 casos de LTA no Estado do Rio de Janeiro, sendo que 1.256 casos ocorreram apenas no município do Rio de Janeiro. No ano de 2003, 49 novos casos foram notificados, 21 na Região Administrativa (R.A.) de Campo Grande e 11 casos na R.A. de Jacarepaguá (Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2007).

1.7.2. Situação da LTA na Região Sul.

No Sul do Brasil, ainda são escassos os estudos sobre flebotomíneos, devido principalmente à inexistência de casos autóctones de LTA até o ano de 1997, quando a

doença foi reportada em vários municípios de áreas costeiras do Estado de Santa Catarina (Grisard et al., 2000). No Estado do Paraná, *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) é a espécie predominante em alguns municípios, enquanto *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) predomina em outros (Teodoro et al., 2006). A possibilidade de participação de *Lu. neivai* na transmissão de LTA na região Sul do Brasil foi sugerida por Marcondes et al. (1997). Estudos sobre a fauna flebotomínea em 37 municípios do Paraná demonstraram que *Lu. neivai* representou 75.6% de todas as espécimes coletadas e a distribuição dessa espécie nas áreas de transmissão da doença reforça a sugestão que este possa ser outro vetor de LTA (Silva et al., 2008).

No Estado do Rio Grande do Sul, foram diagnosticados em 2001 os três primeiros casos de LTA, sendo dois oriundos do município de Santo Antônio das Missões e o terceiro caso, do município de Viamão (Santos *et al.* 2002). No ano de 2002, foram diagnosticados mais dois casos, um relacionado ao município de Porto Alegre e outro em Rolador (Secretaria do Ministério da Saúde-Porto Alegre, 2002). No período de 2002 – 2008 foram confirmados um total de dezenove casos humanos autóctones de LTA em Porto Alegre, os quais apresentaram uma distribuição seqüencial em direção à zona sul do município. Dados epidemiológicos disponíveis comprovam que os mesmos ocorreram no perímetro urbano, em áreas de matas residuais apresentando características de zona rural, com criação de animais e plantações de hortifrutigranjeiros, com mata nativa nas proximidades das casas (Santos et al., 2005). Há de se considerar que o crescente processo de expansão da cidade ocorreu em direção às áreas silvestres remanescentes, com conseqüente desmatamento e preparação de lotes de terra. Além da construção de condomínios, a região teve invasões e assentamentos em propriedades municipais.

Os casos autóctones de LTA registrados no município de Porto Alegre foram devidos à infecção por *L. (V.) braziliensis*, e os estudos da fauna flebotomínea local demonstraram a predominância de *Lu. neivai* e ausência de espécimes de *Lu. intermedia* (revisto por Rangel & Lainson 2009). Investigações recentes realizadas no Sul do país sugerem que a migração de *Lu. neivai* da floresta para áreas residenciais tem resultado no aparecimento de casos de LTA (Dias-Sversutti et al., 2007). Resultados obtidos na presente Tese trouxeram maiores evidências quanto à sugestão da importância de *Lu. neivai* na transmissão da doença em algumas áreas, após a identificação da infecção com *L. (V.)*

braziliensis em espécimes de *Lu. neivai* capturadas em uma área endêmica de LTA no município de Porto Alegre (Pita-Pereira et al., 2009). Adicionalmente, Marcondes et al. (2009) reportaram infecção natural por *Leishmania* spp subgênero *Viannia* nessa mesma espécie de flebotomíneo, em um foco da doença no Estado de Santa Catarina.

1.8. Diagnóstico de infecção natural de flebótomos por *Leishmania* spp.

A capacidade de um flebotomíneo em atuar como vetor é primeiramente determinada pela habilidade de sobrevivência, multiplicação e diferenciação do parasito no interior do trato digestivo do inseto (Lainson & Rangel 2005). Conseqüentemente, a observação e a correta identificação das formas do parasito presentes no intestino do vetor constituem passos importantes para a incriminação de vetores de *Leishmania* e caracterização da doença. Embora as diversas espécies de *Leishmania* sejam morfologicamente semelhantes, elas apresentam graus variáveis de especificidade em relação aos seus hospedeiros invertebrados (Shaw 1994).

O Brasil representa o país com maior número de espécies de flebotomíneos, sendo um total de 229 espécies e subespécies de *Lutzomyia* distribuídas por todo o território brasileiro, entre as 470 espécies descritas no Novo Mundo (Galati 2003); sem considerar que novas espécies de vetores ainda estão sendo encontradas e descritas no país nos últimos anos.

Para a definição de fatores de risco e para o controle epidemiológico das leishmanioses é importante a vigilância contínua das espécies de *Leishmania* e flebotomíneos prevalentes em áreas endêmicas, assim como a identificação de reservatórios. Algumas espécies de flebotomíneos têm sido sugeridas ou incriminadas como transmissoras de leishmanioses, através de observações epidemiológicas e/ou experimentais, tendo principalmente como base o grau de antropofilia, distribuição espacial coincidente com a doença e a incidência de infecção natural por *Leishmania* spp. O conhecimento sobre a ecologia do vetor é essencial quando se busca avaliar a capacidade vetorial de uma espécie particular de flebótomo e os estudos de prevalência da infecção por *Leishmania* nestes insetos contribuem como indicadores funcionais da intensidade de transmissão da doença nas áreas endêmicas. A endemicidade da doença em uma dada localidade está em parte

associada com a distribuição e abundância de insetos vetores flebotomíneos na área de investigação.

1.8.1 Métodos para a detecção de *Leishmania* spp em insetos flebotomíneos

Até o presente, a maioria das investigações epidemiológicas tem objetivado a pesquisa de flagelados no tubo digestivo de flebótomos e o entendimento da associação entre o vetor e o parasito na natureza. Estudos da prevalência de infecção no vetor flebotomíneo podem ser usados como indicador de uma mudança na intensidade de transmissão de *Leishmania* em determinada localidade. Entretanto, deve ser ressaltado que a prevalência no vetor é geralmente baixa e sua estimativa requer a dissecação de um grande número de flebótomos (Martín-Sánchez et al 2006).

A correta identificação das espécies de vetores que ocorrem em uma área endêmica de leishmaniose, bem como a estimativa das taxas de infecção natural pelas diferentes espécies de *Leishmania*, auxiliam na compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle desta parasitose. Com este cenário, estudos têm sido conduzidos através da dissecação de insetos e identificação dos parasitos *in situ* ou através da aplicação de técnicas moleculares para a detecção do DNA de *Leishmania* em insetos silvestres.

A metodologia mais comumente utilizada para a identificação das formas do parasito encontradas no intestino do flebotomíneo fêmea tem sido a dissecação do aparelho digestivo do díptero, seguido do exame microscópico direto entre lâmina e lamínula. Neste caso a positividade das amostras deve ser confirmada posteriormente, com o isolamento do parasito em meio de cultura - frequentemente susceptível à contaminação, e/ou através de inoculação em animais de laboratório. Tal confirmação é essencial, uma vez que os flebótomos são também hospedeiros de outros flagelados, tais como espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, os quais passam por um estágio de promastigota indistinguível das leishmanias, complicando, sobremaneira, o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (Rodríguez et al. 1994; Tesh & Modi 1984). Além desse laborioso procedimento, outros fatores podem limitar o uso da metodologia clássica de dissecação, como por exemplo, sua baixa sensibilidade, especialmente quando se considera a baixa prevalência de infecção

encontrada na maioria dos focos endêmicos (Ashford et al. 1991), associada à dificuldade de processamento de um grande número de amostras necessário para os estudos epidemiológicos. A dissecação do inseto seguida da observação direta do parasito consome tempo, requer grande habilidade técnica devido principalmente ao tamanho reduzido dos insetos flebotomíneos, além da necessidade de se trabalhar com insetos vivos. Apesar de que flebotomíneos podem também ser criopreservados em nitrogênio líquido para posterior dissecação. Até o presente, esta técnica ainda vem sendo empregada com o propósito de isolamento do parasito a partir de um espécime de flebótomo.

A investigação de infecção natural por *Leishmania* através do uso do método convencional de dissecação de flebótomos fêmeas tem gerado taxas de infecção que variam de 0 a 9% (Arias et al. 1985; Gonçalves et al 1985; dos Santos et al 1998), mas em geral estes índices se situam abaixo de 1% para as distintas áreas endêmicas investigadas tanto no Brasil quanto em outros países da América do Sul (Galati et al 1996; Luz et al 2000; Perez et al 1994). Índices de infecção relativamente altos podem ser observados em flebotomíneos capturados em florestas primárias, como a região Amazônica que apresenta uma fauna flebotomínica diversificada e abundante¹ (Lainson et al 1985; Arias & Freitas 1978, Lainson et a 1976, Silveira et al 1991).

Com o intuito de se elevar a freqüência do encontro de flebótomos naturalmente infectados, outras estratégias foram introduzidas. O uso de anticorpos monoclonais específicos em radioimunoensaio e em ensaios de imunofluorescência indireta mostrou ser um teste rápido para a identificação imediata da espécie de *Leishmania* que está infectando o vetor. Além desta abordagem possibilitar a avaliação simultânea de um grande número de exemplares de flebótomos (Adini et al 1998). Da mesma forma, sondas moleculares específicas baseadas no DNA do cinetoplasto ou kDNA de *Leishmania*, foram usadas em ensaios de hibridização para a detecção e identificação de parasitos em vetores flebotomíneos (Ready et al 1988). Contudo, ambas as metodologias para detecção de *Leishmania* em flebótomos não demonstraram boa sensibilidade para serem aplicadas em investigações epidemiológicas.

Nos últimos 20 anos, métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase ou PCR foram desenvolvidos para a identificação de algumas espécies de *Leishmania* isoladas de culturas ou de casos humanos. Os primeiros trabalhos de aplicação da PCR na fauna flebotomínea foram descritos no Novo Mundo (de Bruijn & Barker 1992) e na Índia (Mukherjee et al 1997). A tecnologia de PCR representa um método alternativo para a detecção e identificação de *Leishmania* spp em estudos de campo que visam avaliar a competência vetorial de insetos flebotomíneos e tem revelado valores distintos de sensibilidade e especificidade (Rodríguez et al 1999; Silva & Grunewald 1999; Aransay et al 2000; Córdoba-Lanús et al 2006; Paiva et al 2006; Pita-Pereira et al 2008; 2009; Marcondes et al 2009). Apesar de sua ampla aplicação na análise de amostras entomológicas provenientes de distintas regiões geográficas, em geral, outros métodos se fazem necessários para a posterior caracterização molecular das espécies de *Leishmania* detectadas nos flebótomos. Assim, produtos amplificados contendo DNA de *Leishmania* podem ser submetidos a diversos procedimentos para genotipagem molecular do parasito, tais como, as análises de polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLPs), hibridização com sondas específicas para subgênero/complexo/espécie, sequenciamento ou até mesmo a realização de um segundo ensaio de PCR com iniciadores espécie-específicos (Azizi et al 2006; Garcia et al 2007; Pita-Pereira et al 2005; Jorquera et al 2005; Martín-Sánchez et al 2006).

As principais vantagens do uso da PCR consistem na sua maior sensibilidade e especificidade, comparada aos métodos convencionais, possibilitando a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasito (Fu et al 1998); além da rapidez do diagnóstico quando uma grande amostragem de flebótomos precisa ser avaliada (Barker 1989, Michalsky et al 2002). A PCR aplicada a insetos vetores tem outra vantagem relacionada com a possibilidade de se poder trabalhar com insetos mantidos a seco, congelados ou conservados em etanol, sem afetar o desempenho da reação. Ressalta-se também que a eficiência de detecção pelo ensaio molecular independe do número, estágio de desenvolvimento e localização dos parasitos no tubo digestivo do vetor (Perez et al 1994). Entretanto é reconhecido que fatores adicionais influenciam na sensibilidade da PCR, como por exemplo, o método empregado para extração de DNA, o número de cópias do DNA alvo da amplificação, assim como a variabilidade

genética do alvo selecionado. Existem evidências que diferenças na eficiência de métodos de extração influenciam significativamente na sensibilidade do ensaio molecular. Além disso, o processo de “otimização” de um protocolo baseado na PCR deve resultar em uma combinação perfeita entre o DNA extraído (e conseqüentemente o método de extração) e as condições da PCR (Bastien et al 2008).

O processo de armazenamento de insetos para o diagnóstico de infecção natural utilizando metodologias moleculares, constitui-se em um passo prévio importante a ser sugerido aos entomologistas, de modo a tornar essa ferramenta ainda mais sensível e específica. Recomendam-se assim, a padronização de procedimentos para conservação dos insetos pós-captura e a adequação de protocolos para extração de DNA. A facilidade de transporte das amostras com a adequada preservação do DNA que possibilite manter a sua integridade por longos períodos, é um dos itens importantes a ser considerado. Para tanto, devem ser avaliadas as temperaturas de transporte e condições de conservação (insetos mantidos a seco ou conservados em algum tipo de reagente). Vale a pena ressaltar que certas substâncias utilizadas para a conservação de DNA são quimicamente instáveis, não mantendo a integridade da amostra por muito tempo. Insetos secos a 4°C ou conservados a temperatura ambiente em isopropanol ou etanol 70% têm se mostrado eficientes quanto à preservação do DNA de *Leishmania* (Cabrera et al 2002; Paiva et al 2007).

É sabido que os insetos possuem em seus tecidos, inibidores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR, majoritariamente em seu exoesqueleto, cabeça e tórax (Higgins & Azard 1995; Siridewa et al 1996). Independente da presença de inibidores nos tecidos dos flebótomos, alguns reagentes empregados na etapa de extração de DNA, como exemplos, fenol, clorofórmio, proteinase K ou excesso de EDTA, também podem atuar inibindo a atividade da enzima DNA polimerase e conseqüentemente gerando resultados falso-negativos.

Estudos já demonstraram que o método de PCR é mais eficiente do que as técnicas de dissecação para o processamento e identificação da presença de *Leishmania*, em se tratando de ampla amostragem de flebótomos. Entretanto, a metodologia molecular aplicada a insetos individuais não se torna prática quando centenas ou milhares de espécimes precisam ser

processados. Para contornar tais dificuldades, estudos têm sido conduzidos através da aplicação da PCR em “grupos” ou grupos de flebótomos, gerando como resultados taxas estimadas de infecção (Silva & Grunewald 1999; Miranda et al 2002; Martin-Sanchez et al 2006; Jorquera et al 2005; Pita-Pereira et al 2005, 2008, 2009; Nascimento et al 2007). Além disso, o ensaio molecular tem contribuído para a identificação de espécies de flebotomíneos suspeitas de atuarem como vetores, eliminando o erro que pode ser gerado pela pesquisa do parasito por microscopia, quando se considera que todos os flagelados que se movimentam no interior do trato digestório do flebótomo possam indicar infecção por *Leishmania* (Perez et al 1994; Rodríguez et al 1999).

O aumento da sensibilidade gerado pela PCR tem permitido a estimativa de taxas de infecção de flebótomos por *Leishmania* em várias regiões da América do Sul, incluindo Sucre – Venezuela, com taxa de infecção de 1.3% (Jorquera et al 2005); Urua e Puerto Cabello – Venezuela, com 1.1% (Feliciangeli et al 1994); Chate – Peru, com 1.1% (Perez et al 1994); Chanchan e Alausi – regiões andinas do Equador, com 3.3% (Kato et al 2005); no Brasil – estado da Bahia com 1.5% (Miranda et al 2002); municípios do Rio de Janeiro, Corumbá e Porto Alegre, com 2%, 1,1% e 0,3%, respectivamente (Pita-Pereira e cols. 2005, 2008, 2009) e estado de Pernambuco, com 4% (Carvalho et al 2010). Taxas superiores de positividade, de 8.3% de infecção por *L. infantum* em *Phlebotomus papatasi* na Grécia foram reveladas com o emprego de um ensaio de PCR “seminested” (Aransay et al 2000); de 9.1% de positividade para infecção por *L. (Viannia)* em *Lutzomyia neivai* capturados nas províncias de Tucumán e Salta, na Argentina (Córdoba-Lanús et al 2006) e de 6.7% de *Phlebotomus argentipes* infectados por *Leishmania* spp no Nepal (Pandey et al 2008)

A metodologia de PCR também pode ser usada com a finalidade de medir a quantidade de uma determinada seqüência alvo presente em amostras biológicas, através de sistemas fechados que empregam corantes fluorescentes e que permitem monitorar a reação durante a sua ocorrência em tempo real. Além de possibilitar a quantificação de amostras, outra vantagem da metodologia de PCR em tempo real reside no menor tempo necessário para o resultado final, considerando que a etapa de visualização dos produtos amplificados em gel pode ser eliminada, o que também evita a possibilidade de contaminação do ambiente e de amostras decorrente da manipulação pós-PCR. Em 2005 foi descrito o primeiro trabalho

com PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por sonda TaqMan para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos (Gómez-Saladín et al 2005). Utilizando iniciadores gênero específicos para amplificação do gene da subunidade menor do RNA ribossomal de *Leishmania*, os autores revelaram uma positividade de 2.9% em flebótomos coletados em duas províncias da Sicília, Itália. Contudo, neste trabalho, a PCR em tempo real foi utilizada apenas como uma ferramenta qualitativa. Mais recentemente Ranasinghe et al (2008) desenvolveram um ensaio para a quantificação de *L. chagasi* em espécimes de *Lutzomyia longipalpis* infectados experimentalmente, utilizando uma sonda fluorogênica (TaqMan) desenhada para a sequência interna do gene da DNA polimerase de *Leishmania*.

A quantificação de *Leishmania* em flebotomíneos é importante para avaliar a eficiência do desenvolvimento do parasito nas distintas espécies de vetores que estão envolvidas com a transmissão de uma mesma espécie de *Leishmania*. Neste contexto, as diferenças relacionadas com a adaptação e colonização de uma determinada espécie de parasito no trato digestório do inseto podem justificar as diferenças quanto à capacidade vetorial do mesmo, as quais por sua vez poderão contribuir para a definição do grau de endemidade de áreas com notificações de casos de leishmanioses. Como exemplo, o trabalho de Montoya-Lerma et al (2003) compara a competência vetorial de *Lutzomyia evansi* e *Lu. longipalpis* para transmissão de *L. chagasi* em duas áreas na Colômbia e Venezuela.

1.8.2 Contribuição da metodologia de PCR para a identificação de novas espécies de vetores

Tendo como base a extensa diversidade de espécies de insetos flebotomíneos, cerca de 470 espécies descritas no Novo Mundo, ainda há muito a se estudar sobre potenciais espécies vetoriais. Cerca de 10% dessas espécies foram confirmadas ou suspeitas de serem vetores de *Leishmania*, através de relatos de infecção natural ou experimental (Lainson & Shaw 2005). O sucesso do completo desenvolvimento do parasito no interior dos vetores depende de sua habilidade em superar as barreiras existentes no intestino médio do flebotomíneo, tais como, resistir à ação de enzimas digestivas, sua capacidade em atravessar a membrana peritrófica, assim como de adesão às células epiteliais do intestino médio. Por outro lado, o desempenho de determinadas espécies de flebotomíneos em relação à sua

incriminação como vetor, implica não apenas na sua habilidade de completar a metaciclogênese do parasito, mas também de ser capaz de realizar a sua transmissão (Killick-Kendrick 1990).

O diagnóstico baseado na PCR é importante para determinar a capacidade vetorial em áreas onde coexistam distintas espécies de flebotomos. Contudo, o emprego da metodologia de PCR para detecção de DNA de *Leishmania* no trato digestório de flebotomíneos, não é uma evidência conclusiva para estabelecer que determinadas espécies estejam atuando como vetores. Um resultado de PCR positivo não permite distinguir entre as formas amastigotas (estágio encontrado no interior de macrófagos) adquiridas pela alimentação do inseto no sangue de um mamífero infectado e as formas promastigotas, as quais realmente representam a colonização no intestino do vetor (Aransay et al 2000). Ressaltando que, entre os flebotomos que são positivos para a detecção de DNA de *Leishmania* podem estar incluídos aqueles que carregam fragmentos de DNA resultantes de infecções não-estabelecidas (abortivas) ou provenientes do sangue alimentado. Neste contexto, insetos experimentalmente infectados devem ser usados em ensaios de transmissão visando demonstrar a capacidade vetorial das espécies suspeitas e investigar possíveis ciclos de transmissão (Killick-Kendrick 1999).

Mesmo assim, o encontro de insetos infectados entre espécimes de fêmeas capturadas é uma condição que deve ser considerada na definição do risco de transmissão para o homem e outros hospedeiros que possam atuar como reservatório de parasitos na natureza, contribuindo assim para o entendimento da epidemiologia das leishmanioses em áreas endêmicas. A análise por PCR de flebotomos capturados no campo, tem permitido dar suporte para a incriminação de uma determinada espécie de flebotomo na transmissão de ambas as formas da doença – Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA), em diferentes áreas geográficas (Silva & Grunewald 1999; Aransay et al 2000; Miranda et al 2002; Pita-Pereira et al 2005, 2008, 2009; Córdoba-Lanús et al 2006; Perez et al 2007; Carvalho et al 2008; Savani et al 2009; Carvalho et al 2010).

Como exemplo, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), por mais de 50 anos foi considerada a única espécie vetora de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Cunha & Chagas, 1937, por toda a extensão geográfica de leishmaniose visceral (Lainson & Rangel 2005) nas Américas Central e do Sul. Atualmente já existem relatos na região Centro-Oeste do Brasil, do papel de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) atuando como importante espécie vetorial de LVA, no município de Corumbá - Mato Grosso do Sul, área endêmica que tem apresentado um aumento de notificações da doença em humanos e cães nas últimas duas décadas (Santos et al 1998). Estes dados foram corroborados por Pita-Pereira et al (2008) através do uso de um ensaio de PCR-multiplex associado à hibridização não-radioativa para detecção de *L. infantum chagasi*, tendo como alvo molecular o DNA do cinetoplasto ou kDNA. Neste trabalho os autores também sugeriram *Lutzomyia forattinii* como vetor secundário de LVA naquela região. Estudos anteriores revelaram a predominância de *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* (Galati et al 1985) e o caráter antropofílico de ambas as espécies, sugerindo a possível participação destas espécies de flebotomos na transmissão de leishmaniose visceral em Corumbá (Galati et al 1997). Mais recentemente, em uma área endêmica de LVA no estado de Pernambuco – São Vicente Férrer (Zona da Mata), foi descrito pela primeira vez o relato de infecção natural de *Migonemyia migonei* por *L. (L.) infantum*, com taxa de infecção de 4% (Carvalho et al 2010). Estudos prévios na mesma localidade demonstraram a predominância desta espécie de flebotomo em habitações e abrigos de animais no ambiente peridomiciliar (90%) e a ausência de *Lu. longipalpis* (Carvalho et al 2007). O conjunto destes dados sugere que *Mi. migonei* possa estar atuando na transmissão de *L. infantum* no ciclo doméstico zoonótico em Pernambuco, em áreas de LVA onde o vetor primário – *Lu. longipalpis*, esteja ausente.

Infecção natural de *Lu. migonei* por *L. (V.) braziliensis* foi detectada por PCR em uma área de LTA no Rio de Janeiro (Pita-Pereira et al., 2005), sendo esta espécie de flebotomo incriminada como vetor de leishmaniose tegumentar em outras regiões (Queiroz et al., 1994).

Em um estudo entomológico conduzido por Savani e cols (2009), os autores observaram pela primeira vez *Lutzomyia almerioi* infectado com *L. infantum chagasi* e *L. (Viannia) spp*, através da utilização do método de PCR direcionado para a subunidade menor do RNA ribossomal. O estudo foi realizado no município de Bonito - Mato Grosso do Sul, onde também foi identificada infecção por *L. (Viannia) spp* em *Lu. longipalpis* (taxa de 2.76%). A observação de que as duas espécies de flebotomos encontravam-se naturalmente infectadas

por agentes de ambas as leishmanioses, tegumentar e visceral, sugere que estas espécies poderiam estar atuando na transmissão dessas doenças na área estudada. Vale a pena enfatizar que *Lu. almerioi* pertence ao mesmo grupo monofilético que *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, sendo as duas últimas espécies incriminadas recentemente como potenciais transmissores de LVA no Estado do Mato Grosso do Sul (Galati et al 1997; Pita-Pereira et al 2008). Entretanto, investigações adicionais se fazem necessárias para confirmar, por exemplo, se *Lu. longipalpis* é de fato um vetor de espécies do subgênero *Viannia*, considerando que esta espécie de flebotomíneo é a principal responsável pela transmissão de *L. (L.) infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral americana.

Outro exemplo foi a identificação pela análise por PCR, de *Lutzomyia whitmani* naturalmente infectada com *L. (Viannia) spp* no município de Santa Luzia - Minas Gerais, considerada área endêmica de LTA. Estes dados associados à abundância dos insetos capturados dão suporte à hipótese de que esta espécie de flebótomo contribui para a transmissão de leishmaniose tegumentar no Brasil (Carvalho et al 2008).

Em uma área endêmica de LTA na Argentina, 440 espécimes de fêmeas de *Lu. (Nyssomyia) neivai* foram analisadas para a detecção dos subgêneros *Leishmania (Viannia)* e *Leishmania (Leishmania)*. Destas amostras, 9.1% apresentaram resultados para infecção apenas com parasitos do subgênero *Viannia*, sendo esta a primeira descrição de flebótomos naturalmente infectados na Argentina, pelo uso de PCR seguida de hibridização, além de reportar pela primeira vez infecção senso estrito de *Lu. neivai* (Córdoba-Lanús et al 2006). Estes resultados contribuíram para incriminar esta espécie como vetor de leishmaniose na região e para a identificação do principal parasito circulante como pertencente ao subgênero *Viannia*.

Em uma área periurbana localizada no município de Porto Alegre – Rio Grande do Sul, com casos recentes de LTA, foi estimada taxa de infecção de 1.1% com *L. (V.) braziliensis* em *Lu. (N.) neivai*, através de um ensaio de PCR seguido de hibridização (Pita-Pereira et al 2009). Estes resultados associados com estudos entomológicos prévios que demonstraram ser esta a espécie de flebótomo mais frequentemente encontrada na área estudada – 94.9%, sem haver a identificação de *Lu. intermedia* (Gonçalves 2003), indicam a importância de *Lu.*

(*N.*) *neivai* no ciclo epidemiológico de LTA em Porto Alegre e sugerem esta espécie como outro vetor de *L. (V.) braziliensis* nas regiões sudeste e sul do Brasil. Marcondes et al (2009) também encontraram espécimes de *Lu. (N.) neivai* infectados com *L. (V.) braziliensis* em um foco de LTA no Estado de Santa Catarina através da análise de PCR e hibridização. Os autores relatam a abundância e predominância de *Lu. (N.) neivai* entre as espécies de flebotomíneos capturados (98.5%), indicando que esta espécie deva ser o vetor dominante de *Leishmania (Viannia)* na localidade investigada. Ressalta-se o encontro de *Lu. intermedia*, espécie proximamente relacionada à *Lu. neivai*, infectada com *L. braziliensis* em áreas de ocorrência de LTA no Rio de Janeiro (Rangel et al 1984; Pita-Pereira et al 2005). Estes dados são coerentes com o estudo de Rangel et al (1992), que demonstraram em condições experimentais o desenvolvimento de *L. braziliensis* em *Lu. intermedia*.

1.8.3. Diagnóstico molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase: alvos utilizados

A PCR tem sido aplicada com êxito em trabalhos de campo para estudos da competência vetorial de insetos flebotomíneos, até mesmo em áreas com baixas taxas de infecção. Teoricamente o ensaio possibilita a detecção da presença de um único parasito por flebotomo, sem que elementos do trato digestório do inseto ou o conteúdo do sangue alimentado possam inibir ou interferir na reação de amplificação (Michalsky et al 2002).

Ensaio diagnóstico da fauna flebotomínea pela PCR têm sido desenvolvidos e foram baseados em diferentes alvos moleculares do genoma de *Leishmania*, tais como: minicírculos do kDNA, genes da subunidade menor do ribossomo, seqüências espaçadoras do gene de mini-exon, seqüências subteloméricas e seqüências nucleares de cópia única, como o gene de citocromo b e gene da DNA polimerase α .

A sensibilidade destes sistemas pode ser aumentada quando são utilizadas como alvo de detecção do parasito, seqüências representadas em múltiplas cópias, tais como, DNA do cinetoplasto, genes de RNA ribossomal, genes de mini-exon ou repetições genômicas. O emprego de regiões conservadas ou variáveis presentes nestes alvos permite adaptar a especificidade da PCR em nível de gênero, complexo, espécie ou até mesmo o isolado individual.

Os minicírculos que constituem a rede de DNA do cinetoplasto ou kDNA, têm sido amplamente usados como alvo molecular para a detecção do DNA de *Leishmania* (Degrave et al 1994). Estas moléculas estão representadas em aproximadamente 10.000 cópias por célula, distribuídas em cerca de 10 classes de seqüências diferentes, com tamanhos que podem variar de 0,75 a 1 kb, sendo estas seqüências conhecidas para a maioria das espécies de *Leishmania* (Breniere et al 1999; Brewster & Barker 2002). Os minicírculos possuem uma região de seqüência conservada, de aproximadamente 120 pb, comum a todas as espécies do gênero *Leishmania* e uma região de seqüência altamente variável que permite discriminar entre as diferentes espécies. Neste caso, após a amplificação da região de seqüência variável, são empregadas outras metodologias como, RFLP, hibridização com sondas específicas ou sequenciamento para a identificação do parasito em nível de complexo ou espécie. Fragmentos clonados de minicírculos têm sido empregados como sondas moleculares de hibridização, possibilitando discriminar entre espécies e sub-espécies de *Leishmania* (Wirth and Pratt 1982; Degrave et al 1994).

1.8.4 Considerações finais:

A principal estratégia para o controle das leishmanioses inclui a ação combinada do encontro de casos da doença em humanos e tratamento, o controle vetorial e, em focos zoonóticos, o controle de reservatórios animais. As medidas de prevenção e controle devem ser avaliadas em termos de custo-benefício nas diferentes situações epidemiológicas nas quais estas medidas serão contempladas. Estimativas da prevalência de infecção na população de vetores tornam-se importantes para avaliar o resultado dos programas de controle na transmissão das leishmanioses. Também tem sido sugerido que mudanças ambientais e, em particular, as alterações climáticas podem influenciar os padrões de veiculação de doenças transmitidas por insetos vetores. Contudo, não temos conhecimento de como, ou de qual extensão, estas mudanças irão afetar a distribuição geográfica de flebotomíneos ou a transmissão de *Leishmania* por estes vetores. Maiores informações concernentes à distribuição deste parasito na fauna flebotomínea são essenciais para o melhor conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e para o desenvolvimento de ações efetivas de controle da doença.

2. Justificativa

Entre os fatores que dificultam o controle das leishmanioses está a diversidade das espécies de ambos: parasito e vetor. Ainda são escassos os registros de infecção natural de flebotomos em seus ecótopos, ensejando desta forma novos estudos para a melhor compreensão da cadeia epidemiológica das diferentes formas da doença. A taxa de flebotomos naturalmente infectados nas áreas endêmicas, assim como a correta identificação da espécie de *Leishmania* infectiva, são de primordial importância para a epidemiologia das leishmanioses. O diagnóstico de infecção natural nos vetores representa um dos critérios para incriminar uma espécie de flebotomo como transmissora de leishmanioses. Considerando a baixa sensibilidade dos métodos clássicos de descrição de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp, além do fato desses testes serem extremamente laboriosos e exigirem um tempo maior para a confirmação dos resultados, o presente estudo tem como foco: (i) a aplicação de um ensaio de PCR multiplex desenvolvido pelo nosso grupo (Pita-Pereira et al., 2005), o qual será aplicado não apenas para a estimativa da taxa de infecção natural por *Leishmania* spp em espécimes de flebotomos coletados em áreas endêmicas do Brasil para ambas, Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana, mas também com o intuito de identificar novas espécies do gênero *Lutzomyia* que possam estar atuando como vetores secundários em determinadas localidades; (ii) o desenvolvimento e validação da tecnologia de PCR em tempo real, para a medida da carga parasitária nos flebotomos naturalmente infectados com *Leishmania* spp. Desta forma, estaremos trazendo maiores informações para os estudos epidemiológicos e entomológicos da fauna flebotomínea em diversas localidades nas quais têm sido notificados casos recentes de ambas as formas da doença, visando contribuir para a compreensão do papel do vetor na ocorrência de leishmanioses tegumentar e visceral, em áreas endêmicas de baixa, média e alta endemicidade.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Aplicar o ensaio de *PCR multiplex* associado à hibridização com sonda biotilada e detecção por quimioluminescência no diagnóstico molecular de flebotomíneos naturalmente infectados com *Leishmania* spp. Além disso, com intuito de contribuir para a compreensão do papel do vetor na ocorrência da doença nas áreas de alta, média e baixa endemicidades para leishmaniose visceral e/ou tegumentar, será desenvolvida a metodologia de PCR em tempo real para a medida da carga parasitária nos insetos coletados nas respectivas áreas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os índices de infecção natural de flebotomos coletados nas áreas de baixa, média e alta endemicidades para leishmaniose visceral e/ou tegumentar, utilizando a técnica de *PCR multiplex* associada à hibridização não-radioativa;
- Correlacionar as diferentes espécies de vetores capturados nas áreas de estudo selecionadas, com as espécies de *Leishmania* detectadas e identificadas pela abordagem molecular proposta;
- Otimizar a tecnologia de PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR *green* para a quantificação de leishmanias presentes em amostras reconstituídas;
- Avaliar a carga parasitária por PCR em tempo real, nos insetos vetores capturados nas áreas cujos índices de infecção natural foram previamente definidos pelo ensaio qualitativo de *PCR multiplex*;
- Correlacionar carga parasitária nos flebotomos de acordo com a maior ou menor endemicidade das áreas selecionadas, buscando uma melhor compreensão do papel dos vetores na transmissão de ambas as formas de leishmaniose nas respectivas áreas endêmicas.

4. Material e Métodos

4.1. Cultivo de células.

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. (L.) major* (MHOM/SU/73/5ASKH), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e *L. shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), foram gentilmente cedidas pela Dra. Elisa Cupollilo (Coleção Científica de *Leishmania* spp do Instituto Oswaldo Cruz). Os parasitos foram mantidos inicialmente, na forma de inóculo, em meio semi-sólido Novy, Mc Neal e Nicolle (NNN) a 28 °C. Para obtenção da massa de células, os parasitos foram transferidos para meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion* - 40 g/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 500 U/mL e estreptomicina 500 µg/mL, e mantidos a mesma temperatura. As culturas foram ampliadas por sucessivas passagens, a cada quatro dias, até alcançarem a concentração de parasitos necessária, em torno de 10^8 células/mL.

4.2. Obtenção de diferentes concentrações de parasitos para os ensaios com amostras reconstituídas.

Para a obtenção de diferentes concentrações de parasitos, quatro alíquotas com cerca de $2,6 \times 10^7$ promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), duas alíquotas para cada espécie, foram previamente lavadas por três vezes (3.020 g, 15 minutos, 4 °C) em solução salina (NaCl) a 0,85% contendo 0,01 M de fosfato de sódio (Na HPO₄/NaPO₄), pH 7,2 (Tampão PBS). Após as lavagens, uma alíquota de cada espécie foi submetida à análise por citometria de fluxo (*cell sorting*), em placas de 96 poços com fundo arredondado (Nunc-immuno Plate. Nalgen nunc international, Denmark), contendo por poço 100 µL de solução de Tris-EDTA (TE 1X; 10 mM Tris-HCl pH 9,2; 10 mM de EDTA), para obtenção de amostras selecionadas representando diferentes concentrações de parasitos ($10^3 - 10^2$). Nestes ensaios foi utilizado o citômetro de fluxo EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Hialeah, FL). Os promastigotas assim obtidos foram congelados em placas de 96 poços (- 20 °C) até o momento de serem adicionados aos *grupos* de lisados de flebótomos constituídos de 10 insetos machos, cada.

As formas promastigotas das outras duas alíquotas correspondendo à *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi*, foram submetidas à contagem em câmara de

Neubauer, diluídas em série e cada diluição foi adicionada a um *grupo* de 10 flebotomos machos, para posterior extração de DNA.

4.3. Seleção das áreas endêmicas para as coletas de flebotomíneos.

4.3.1. Município do Rio de Janeiro (RJ).

As coletas de flebotomíneos foram realizadas em cinco áreas focais endêmicas, representando áreas de média endemicidade para leishmaniose tegumentar, com notificações de casos recentes em cães e humanos, adjacentes ao Maciço da Pedra Branca, localizado na porção central do município do Rio de Janeiro, no distrito de Jacarepaguá. As cinco localidades investigadas foram: Colônia Juliano Moreira, Pau da Fome, Cachamorra, Cabuçú, Lameirão Pequeno. As armadilhas foram distribuídas em torno dos domicílios em áreas peridomiciliares e anexos. O Maciço da Pedra Branca contraforte da Serra do Mar fica situado entre os paralelos 20° 50` latitude norte e 23° 05` latitude sul, e os meridianos 43° 35`, leste e 43° 20' a oeste de Greenwich.

4.3.2. Município de Saquarema (RJ).

O município de Saquarema está localizada na planície do Litoral do Estado do Rio de Janeiro, com uma área de 353,2 km² e 52.000 habitantes (IBGE 2006). Apresenta clima tropical úmido e uma temperatura média de 22° C. A vegetação secundária é predominante (30%), dominada por pastos e campos gerais. As capturas de flebotomíneos foram realizadas em uma área rural no município de Saquarema, conhecida como Rio Seco (S 22051'14"W 42029'27"), de baixa endemicidade para leishmaniose tegumentar. O local estudado apresenta um aspecto rural, próximo ao maciço de Mato Grosso, onde a vegetação típica de Mata Atlântica ainda está presente. Flebotomíneos foram coletados no peridomicílio, em abrigos de animais (galinheiro e chiqueiro).

4.3.3. Município de Rio Bonito (RJ).

Rio Bonito é um município de 49.600 habitantes com área total de 463,3 km² dividido em três distritos: Rio Bonito (sede), Boa Esperança (primeiro distrito) e Basílio (segundo distrito). Está localizado na região da Baixada Litorânea, a 80 km da capital do Estado, sendo passagem para a Região dos Lagos. Apresenta uma latitude 22°42'31" sul e longitude 42°36'35" oeste, com uma altitude de 40 metros. O município tem clima tropical úmido. A

vegetação é privilegiada pelo clima, com resquício de vegetação natural da mata atlântica. As capturas de flebotomos foram realizadas na área de Catimbau Grande (22°47'33" sul e 42°34'32" oeste) localizada no distrito de Boa Esperança, em uma casa onde casos de LTA foram descritos. As armadilhas foram distribuídas em torno do domicílio e nos anexos de animais (galinheiro).

4.3.4. Município de Além Paraíba (MG).

Além Paraíba, no estado de Minas Gerais, é um dos municípios limítrofes ao Estado do Rio de Janeiro, e está localizado na região conhecida como Zona da Mata. Sua população estimada em 2007 era de 34.591 habitantes. Nesse município, casos humanos de LTA ocorrem principalmente na população rural, e é considerado como área de baixa endemicidade de leishmaniose tegumentar. Nos últimos quatro séculos, esta região sofreu um desmatamento intenso devido ao aumento das atividades agrícolas e pecuária. Os flebotomíneos foram coletados em uma área rural da cidade localizada nas proximidades de Benjamin Constant. (21°5'28" S, 42°54'60" O), em abrigos de animais no peridomicílio (galinheiro e chiqueiro).

4.3.5. Município de Corumbá (MS).

Corumbá, pertencente ao Complexo do Pantanal, está situado ao nordeste do Estado do Mato Grosso do Sul (18°59'57.44" S, 57°38'46.73" O), na fronteira do Brasil com a Bolívia, e representa uma área com transmissão ativa de leishmaniose visceral em cães e humanos. A cidade de Corumbá tem uma área de 65.166 m² estando localizada na margem oeste do rio Paraguay. A cidade se encontra sobre rochas calcárias, com ocorrência de colinas cobertas com vegetação esparsa. A área é comparável às regiões semi-áridas do Brasil, onde ocorre a maioria dos casos de LVA. As capturas de flebotomíneos foram realizadas no peridomicílio, no bairro do Cristo Redentor (19°01'46.02" S, 57°38'21.51" O).

4.3.6. Município de Porto Alegre (RS).

As capturas de flebotomíneos foram realizadas em uma área periurbana denominada Quinta do Portal, localizada na periferia da cidade de Porto Alegre, que compreende um sítio de lazer voltado para o turismo rural, com áreas de vegetação residual, onde foram descritos

casos humanos recentes de LTA. Esta propriedade fica situada na divisa dos bairros de Lomba do Pinheiro e Belém Velho, no município de Porto Alegre. Dez armadilhas no total foram distribuídas no interior de domicílios, no peridomicílio, em locais com presença de animais domésticos e silvestres, tais como: curral, canil, galpão com coelhos e codornas, viveiro de araras, gaiola de periquitos australianos, e na mata ao redor da propriedade.

4.4. Capturas de flebótomos e identificação taxonômica.

Para as capturas foi empregada a Armadilha Luminosa de Sucção (ALS) do tipo CDC (Figura 2). As armadilhas luminosas foram introduzidas às 18h e recolhidas às 7h da manhã seguinte, totalizando 13 horas de coleta/armadilha. Os insetos adultos foram coletados vivos e transferidos para recipientes plásticos etiquetados. Após serem transportados para o laboratório foram congelados em freezer a - 20°C e submetidos à identificação de espécie. As fêmeas foram dissecadas sobre uma gota de solução de EDTA (10 mM) em lâmina de microscopia. Com o auxílio de agulhas descartáveis, tiveram cortadas o penúltimo segmento abdominal, e deste conjunto foi examinada a genitália feminina, ou seja, as espermatecas e seus anexos, para identificação taxonômica no nível de espécie, de acordo com Young & Duncan (1994). Após a caracterização de espécie, o restante do corpo do inseto foi introduzido em tubo eppendorf de 1,5 mL rotulado, para a constituição de *grupos* de 10 insetos fêmeas pertencentes a mesma espécie/localidade. Insetos machos também foram identificados quanto à espécie, com base nas suas características morfológicas. *Grupos* de 10 insetos machos da mesma espécie foram formados para serem usados nos experimentos de reconstituição, assim como controles negativo nos ensaios diagnósticos. Os tubos contendo o *grupo* de flebótomos foram mantidos à - 20 °C até serem usados para extração de DNA. Deve-se ressaltar que para cada inseto dissecado foram utilizadas duas agulhas descartáveis, evitando assim a contaminação do material a ser utilizado nas provas de PCR.



Figura 2: Armadilha utilizada na coleta dos flebótomos. Armadilha luminosa do tipo CDC. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Marcos S. Barbosa (DCB/ENSP/FIOCRUZ).

4.5. Obtenção de lisado de flebótomos.

Cada grupo de 10 flebótomos mantidos em 100 μ L de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM de EDTA) foi incubado por 2 horas a 56 °C com 100 μ g/mL de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), com agitações periódicas. Após centrifugação a 13.000 g por 15 mins, a 4 °C, o sobrenadante recuperado foi aquecido a 95 °C por 15 mins para inativação da proteinase K. Os volumes das preparações foram ajustados para 200 μ L com TE 0,1X e as amostras correspondendo aos lisados de flebótomos foram estocadas a – 20 °C até o momento da extração do DNA total.

4.6. Extração de DNA.

Para a extração de DNA a partir de lisados de flebótomos foram empregadas duas metodologias distintas, a seguir:

A) Extração por Fenol-Clorofórmio: Um volume correspondente a 200 μ L do lisado de 10 flebótomos foi acrescido de 200 μ L de solução de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v; Introgen Corporation, CARLSBAD, CA), e centrifugado (13.000 g, 8 minutos, 25

⁰C). O sobrenadante obtido (S1) foi coletado e reservado, e o precipitado foi lavado com 200 µL de água ultra-pura, por centrifugação (13.000 g, 8 minutos; 25 ⁰C) para obter o segundo sobrenadante (S2). Os dois sobrenadantes foram reunidos para serem tratados (v/v) com clorofórmio (Merck S.A. Indústrias Químicas) e centrifugados (13.000 g, 8 minutos, 25 ⁰C). O novo sobrenadante (S3) foi recuperado e o DNA precipitado pela adição de 0,3 M de acetado de sódio (C₂H₃O₂Na.3H₂O; Sigma Chemical Co., St Louis Missouri, USA) e dois volumes de etanol absoluto (Merck S.A.), com incubação em banho de gelo (15 minutos, 4 ⁰C) e posterior centrifugação (13.000 g, 15 minutos, 25 ⁰C). O precipitado final foi seco (5 minutos, entre 75 e 80 ⁰C), o DNA solubilizado em 50 µL TE 0,1X e estocado (- 20 ⁰C) até o momento do uso.

B) Extração com emprego de minicolunas contendo Sílica: Um volume correspondente a 200 µL do lisado de 10 flebotomos foi submetido à extração de DNA utilizando o kit comercial *Wizard SV Genomic DNA Purification System* (PROMEGA, Madison, WI, EUA), segundo as especificações do fabricante. O DNA recuperado foi eluído em 50 µL TE 0,1X e estocado a - 20 ⁰C até o momento de uso.

Para ambos os protocolos de extração foi feita a avaliação da concentração e pureza do DNA recuperado, através da estimativa de concentração por medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260nm (A₂₆₀) e 280nm (A₂₈₀) em espectrofotômetro GeneQuant. A pureza das amostras de DNA foi verificada pela relação A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀.

Todas as etapas que envolveram a extração de DNA dos flebotomos fêmeas foram monitoradas pela inclusão de amostras controles negativo, que correspondiam aos machos capturados no campo. Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro e exposição a raios ultravioleta no equipamento UV Stratalinker 2400 (STRATAGENE, USA).

Como amostras controle positivo para os ensaios posteriores de PCR, o DNA total de promastigotas de cultura de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi* foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio.

4.7. Reação em Cadeia da Polimerase – *Hot-start* PCR multiplex.

Para os ensaios de PCR, foram utilizados dois pares de *primers* simultaneamente. O primeiro par amplifica a região constante no minicírculo do kDNA do gênero *Leishmania* (Figura 3): *primer* A: 5' (G/C)(G/C)(C/G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC 3' e *primer* B: 5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3' (Passos et al, 1996); o segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebótomos do gênero *Lutzomyia (cacophany)*: 5Llcac 5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'e 3Llcac 5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'(Lins et al., 2002). As reações ocorreram em um volume final de 100 μ L, consistindo de solução tampão da PCR 1X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl - solução PCR 10X, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 μ M de cada *primer*, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems), 10 μ L de DNA e H_2O (ultra pura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume.

A mistura de reação foi incubada no termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 94 °C por 12 mins para ativação da enzima (*hot-start* PCR), seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segs a 94 °C, 30 segs a 55 °C e 30 segs a 72 °C. Após o último ciclo, a reação foi submetida a uma extensão final por 10 mins a 72 °C.

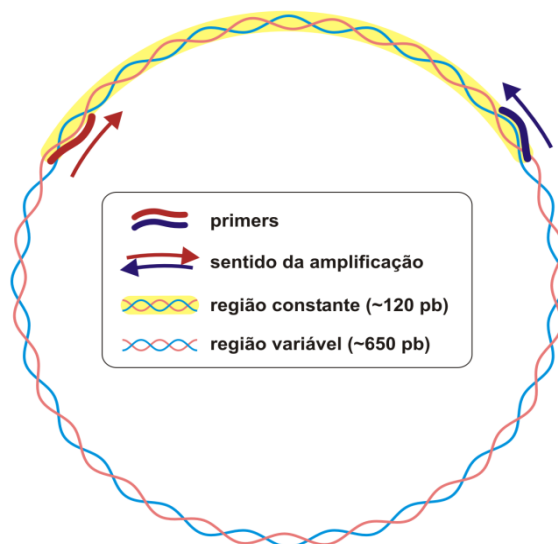


Figura 3: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação.

4.8. Análise dos produtos amplificados.

Para a detecção dos produtos amplificados (*amplicons*) foram usados dois sistemas de análise em fase sólida: 1) migração eletroforética em gel de agarose tendo como marcadores de peso molecular, fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos em pares de bases, dentro da faixa compatível de tamanho dos fragmentos de DNA amplificados; 2) adsorção em membrana de náilon para a etapa de hibridização e posterior revelação com reagente quimioluminescente (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

4.8.1. Eletroforese em gel de agarose.

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal (12,5 x 20 cm) em géis de agarose a 2% (Seakem e NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) preparados em TBE 1X (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M Ácido Bórico; 0,024 M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Alíquotas de 10 µL dos produtos da PCR foram misturadas com 1 µL do tampão de aplicação de amostras (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 horas à 70 V. O peso molecular dos *amplicons* foi determinado pela inclusão nos géis do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – Invitrogen Life Technologies). Após a eletroforese, o gel foi corado (15 minutos) em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL de brometo de etídio em TBE 1X) e descorado (15 minutos) em água destilada. Após esta etapa os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA)

4.8.2. Dot-Blot hibridização.

Os produtos amplificados também foram analisados por hibridização em fase sólida. Inicialmente, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, que consistiu em aquecimento (100 °C, 3 minutos) de 10 µL dos *amplicons* diluídos em 90 µL de água destilada, seguido de um rápido resfriamento (4 °C) e a adição de 13 µL de solução desnaturante (4N NaOH contendo 25mM EDTA pH 8.0). O material desnaturado foi adsorvido por vácuo moderado à membrana de náilon (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), previamente umedecida em água destilada e acondicionada em aparelho Bio-Dot (Bio-Dot™; BioRad, Richmond, CA, USA) . Após a adsorção dos *amplicons*,

as áreas de aplicação da membrana foram tratadas com 100 µL/poço de água destilada, seguida de 100 µL/poço da solução desnaturante. A membrana foi removida do Bio-Dot™, lavada em solução salina contendo citrato de sódio, SSC 2X (300 mM de NaCl e 30 mM de C₆H₅Na₃O₇ – SSC 20X) e seca à temperatura ambiente. Finalmente, o DNA foi covalentemente fixado a membrana por irradiação com luz UV em aparelho Stratalinker™ (STRATAGENE, USA) durante dois minutos.

Para a reação de hibridização, as membranas contendo o DNA foram pré-tratadas (3 horas, 60 °C) em solução BLOTTO (SSC 1,5X; 1% de Dodecil Sulfato de Sódio - SDS; 0,5% de leite desnatado Mollico^R), em forno de hibridização (Techne Inc, Princeton N.J./USA). Posteriormente, as membranas foram incubadas (16 horas, 56 °C) com 5 ng/mL de sonda biotilada específica na mesma solução BLOTTO. Para as hibridizações, dependendo da área investigada, foram utilizadas as seguintes sondas marcadas com biotina na extremidade 5', que foram desenhadas para uma seqüência interna da região conservada dos minicírculos do kDNA: (1) sonda específica para *Leishmania Viannia*: 5' TAA TTG TGC ACG GGG AGG CCA (Fernandes et al., 1996); (2) sonda específica para *Leishmania infantum*: 5' AAA AAT GGG TGC AGA AAT (Francino et al., 2006).

Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas (5 vezes/5 minutos cada) com tampão de lavagem PBS 1X (NaCl a 0,85 %, 0,01 M de fosfato de sódio NaHPO₄/NaPO₄, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (BioRad) à temperatura de 25 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas (1 hora, 25 °C) no mesmo tampão acrescido do conjugado Streptavidina-Peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído 1/100. Após um novo ciclo de lavagem das membranas (5 vezes/5 minutos cada) na solução PBS-Tween 20, a 25 °C, a reação de hibridização foi revelada usando reagente Luminol (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

4.9. PCR em Tempo Real (Sistema SYBR Green).

Foi utilizado o sistema que emprega o corante fluorescente SYBR *green* - com capacidade de se intercalar na dupla fita de DNA sintetizada em cada ciclo de amplificação, com os mesmos conjuntos de *primers* empregados nos ensaios de PCR convencional multiplex (para a região conservada do minicírculo do kDNA do gênero *Leishmania*; para o

gene constitutivo específico de flebotomos do gênero *Lutzomyia*), porém os ensaios de PCR ocorreram em reações separadas para cada par de *primers*, não sendo multiplex. A introdução do par de *primers* para o gênero *Lutzomyia* se fez necessária para controlar os ensaios de quantificação de parasitos presentes nos flebotomíneos, assim como para avaliar a homogeneidade das extrações de DNA obtido dos lisados de 10 insetos, possibilitando assim a correta quantificação das amostras.

A concentração e o volume dos reagentes foram otimizados para padronização da metodologia (ver Tabela 3), através da comparação de dois kits comerciais distintos de PCR em tempo real - SYBR green e Power SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 3: Otimização da reação de PCR em tempo real utilizando os dois sistemas de detecção (Power e SYBR green)

Reagentes por reação	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Mix (Power e SYBR green)	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
[]de primers	5pmol	4pmol	3pmol	2pmol	1pmol
DNA	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
H ₂ O	2,5 µL	3,5 µL	4,5 µL	5,5 µL	6,5 µL
Volume total	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Reagentes por reação	Mix 6	Mix 7	Mix 8	Mix 9	Mix 10
Mix (Power e SYBR Green)	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
[]de primers	5pmol	4pmol	3pmol	2pmol	1pmol
DNA	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
H ₂ O	5,5 µL	6,5 µL	7,5 µL	8,5 µL	9,5 µL
Volume total	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Reagentes por reação	Mix 11	Mix 12	Mix 13	Mix 14	Mix 15
Mix (Power e SYBR Green)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
[]de primers	5pmol	4pmol	3pmol	2pmol	1pmol
DNA	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
H ₂ O	0,5 µL	1,5 µL	2,5 µL	3,5 µL	4,5 µL
Volume total	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

Os ensaios de PCR quantitativo foram processados no equipamento ABI Prism 7000 (*Sequence Detector System – Applied Biosystems*), seguindo as mesmas condições de termociclagem descritas anteriormente para a PCR convencional (*Hot-start PCR multiplex*), acrescida apenas de um programa para a análise da curva de dissociação térmica dos produtos amplificados. Assim, imediatamente após a amplificação, os produtos foram submetidos à uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 segs, e o programa consistiu em um aumento gradual de temperatura de 0,1 °C/seg, variando de 72 – 90 °C. Essa etapa final permite a discriminação do produto específico, através do estabelecimento da curva de dissociação que determina qual a temperatura de *melting* (T_m) onde 50% dos produtos amplificados encontram-se desnaturados, com conseqüente liberação do corante fluorescente, determinando assim uma queda brusca da fluorescência emitida. A plataforma ABI Prism 7000 foi utilizada para as reações de PCR em tempo real, coleta de dados e análise dos resultados.

Para a determinação do número de parasitos presentes nas amostras de insetos do campo, foi necessário introduzir em cada experimento de quantificação, amostras padrão contendo números pré-estabelecidos de promastigotas de cultura ou concentrações de DNA previamente definidas, para o estabelecimento de uma curva padrão de calibração. O Ct ou *threshold cycle* (ciclo inicial no qual a fluorescência da amostra excede o limite basal de fluorescência do sistema) dessas amostras irá constituir a curva padrão de quantificação, a qual será usada para inferir os valores de Cts das amostras de campo que serão analisadas. Todos os ensaios foram realizados com réplicas intra-experimentos (duplicatas e triplicatas de cada amostra) e inter-experimentos (três a quatro experimentos com as mesmas amostras).

4.9.1. Estabelecimento da Curva Padrão de Calibração.

Para o preparo das amostras de DNA usadas para o estabelecimento da curva padrão de calibração, foram testadas duas estratégias que consistiram em amostras reconstituídas experimentalmente, a partir de *grupos* formados por dez insetos machos de *Lu. longipalpis*, a seguir:

(A) Obtenção de diferentes concentrações de promastigotas de cultura de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi* - Após as lavagens, as células foram contadas em

câmara de Neubauer, diluídas em série ($10^3 - 10^2$) e cada diluição foi adicionada a um *grupo* de 10 flebotomos machos para posterior extração de DNA (fenol-clorofórmio e minicoluna de sílica).

(B) Obtenção de diluições seriadas de DNA, a partir de DNA extraído de 10^4 células de cultura de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi* (por fenol-clorofórmio e minicoluna de sílica). Em seguida, cada diluição de DNA de cada espécie de parasito obtido pelos dois métodos de extração, foi misturada à uma concentração fixa correspondendo a 200 ng de DNA total de lisado de flebotomos machos, o qual também foi previamente extraído por fenol-clorofórmio e minicoluna de sílica.

4.10. Isolamento e sequenciamento dos fragmentos de kDNA das diferentes cepas estudadas.

Inicialmente foi realizado um ensaio de PCR convencional a partir de DNA extraído de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi*, utilizando apenas os *primers* que amplificam a região conservada dos minicírculos de kDNA do gênero *Leishmania* e utilizando as mesmas condições de ciclagem dos experimentos anteriores. Após o término da reação, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Sigma Chemical Co, St Louis) a 2% em TBE 1X, por 45 minutos a 100 V, e submetidos à purificação utilizando kit comercial Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (PROMEGA, Madison, WI, EUA), conforme protocolo descrito pelo manual do fabricante.

Após a quantificação do DNA purificado por espectrofotometria, os fragmentos foram ligados ao vetor de clonagem TOPO[®], utilizando kit comercial TOPO TA cloning[®] Kits (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA). Parte da ligação (2 μ L) foi utilizada para transformar 100 μ L de células competentes (*E. coli* DH5 α). Os clones gerados foram inoculados em meio LB com ampicilina (75 mg/mL) e mantidos sob agitação (250 rpm) a 37 °C *overnight*. A mini-preparação plasmidial foi realizada através da utilização do kit Flexiprep (Amersham), segundo as especificações do fabricante. A digestão plasmidial foi realizada utilizando-se a enzima Eco RI por 2hs à 37° C. Após análise eletroforética, os clones que se mostraram positivos para os fragmentos de kDNA foram, então, sequenciados.

O fragmentos foram sequenciados utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA) versão 3.1. As condições de termociclagem consistiram numa desnaturação inicial de 94 °C com posteriores 25 ciclos a 96 °C por 30 seg, 50 °C por 1 min e 60 °C por 4 min, e os produtos amplificados foram posteriormente precipitados. O precipitado foi eluído em formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para fins de sequenciamento foi utilizado o sequenciador ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA).

A homologia dos fragmentos gerados foi verificada através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, T.A. 1999). A árvore foi construída com o programa MEGA 3.1 (Kumar et al, 2004) utilizando o método Neighbor-Joinig e Kimura 2-parâmetros.

4.11. Análise Estatística.

Para a caracterização qualitativa do status de infecção dos flebótomos amostrados, correlacionando índice de infecção entre as distintas espécies de insetos capturados e respectivas áreas estudadas, foram empregados os testes de χ^2 e exato de Fisher. A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios quantitativos por PCR em tempo real, foi realizada utilizando o teste t de *Student*. Ressalta-se que para as análises estatísticas relacionadas aos ensaios quantitativos de determinação da carga parasitária nos flebótomos, apenas as amostras que ficaram no intervalo de confiabilidade (IC 95%) dos valores das médias de Cts do controle endógeno (gene *cacophony*) foram consideradas. Para esse cálculo, a seguinte fórmula foi utilizada, sendo EP o erro padrão:

$$\text{IC 95\% Médias} = \text{Média} \pm 2,571 * \text{EP(Erro Padrão)}$$

5. Resultados

5.1 - FASE I: Nesta etapa foi constituído o material biológico para as análises moleculares de avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp nos insetos flebotomíneos coletados em diferentes áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar e/ou visceral. Os grupos de flebotomos foram constituídos por espécie e área de origem, consistindo em áreas de baixa, média e alta endemicidade para leishmanioses. Respeitando estes critérios os insetos foram separados em machos e fêmeas, compondo um grupo de 10 flebotomos para análise (Tabela 4). Os *grupos* de insetos machos foram usados apenas como controles negativo para a etapa de extração de DNA, com intuito de controlar eventuais contaminações nas análises diagnósticas por PCR.

Classificação de áreas com transmissão de leishmaniose visceral (LVA) [Ministério da Saúde/SVS, 2003]:

Transmissão esporádica – média de casos/ano $\leq 2,4$

Transmissão moderada – média de casos/ano $> 2,4$ e $\leq 4,4$

Transmissão intensa – média de casos/ano $\geq 4,4$

Classificação de áreas com transmissão de leishmaniose tegumentar (LTA), média de casos/100.000 habitantes [Ministério da Saúde/SVS, 2007]:

Quartil - Parâmetro

1.º $< 2,5$ – Transmissão baixa

2.º $\geq 2,5$ $< 10,0$ – Transmissão média

3.º $\geq 10,0$ $< 71,0$ – Transmissão alta

4.º $\geq 71,0$ – Transmissão muito alta

As áreas de baixa endemicidade para leishmaniose tegumentar analisadas foram: Saquarema (RJ), Rio Bonito (RJ), Além Paraíba (MG) e Porto Alegre (RS). Em Saquarema, foi coletado um total de 460 insetos, correspondendo às espécies *Lu. intermedia* (130 machos e 300 fêmeas) e *Lu. migonei* (30 fêmeas). Na localidade de Rio Bonito, foram coletados 350 insetos sendo todos *Lu. intermedia* (80 machos e 270 fêmeas). Em Além Paraíba, todos os 410 insetos coletados também correspondiam à *Lu. intermedia* (110 machos e 300 fêmeas).

Em Porto Alegre, município onde tem sido relatado notificações recentes de leishmaniose tegumentar em humanos, foram coletados 3770 insetos, representantes de quatro espécies distintas do gênero *Lutzomyia*. A espécie predominante foi *Lu. neivai*, com 2530 espécimes (1550 machos e 980 fêmeas), seguido de 640 exemplares de *Lu. migonei* (360 machos e 280 fêmeas), 540 de *Lu. fischeri* (20 machos e 520 fêmeas) e finalmente *Lu. lanei*, com 60 exemplares (40 machos e 20 fêmeas).

Na cidade do Rio de Janeiro, considerada área de média endemicidade para leishmaniose tegumentar, os flebótomos foram coletados em cinco localidades situadas no maciço da Pedra Branca. As localidades de Cachamorra, Lameirão Pequeno e Cabuçú, correspondem à região administrativa de Campo Grande; enquanto, Pau da Fome e Colônia Juliano Moreira pertencem à região administrativa de Jacarepaguá. Nas cinco áreas, um total de 720 insetos foi capturado, constituindo em 590 exemplares de *Lu. intermedia* (270 machos e 320 fêmeas) e 130 espécimes de *Lu. migonei* (80 machos e 50 fêmeas).

No município de Corumbá, onde casos recentes de leishmaniose visceral foram notificados em cães e no homem, um total de 450 flebótomos foi capturado, correspondendo a 250 espécimes de *Lu. cruzi* (120 machos e 130 fêmeas) e 200 de *Lu. forattinii* (60 machos e 140 fêmeas).

A Tabela 4 apresenta o consolidado de espécimes de flebótomos encaminhado para a avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp.

Tabela 4: Consolidado de espécimes de flebotomos encaminhado para a avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp. Separados por espécie e sexo.

Localidades	Espécies								Total (♂/♀)
	<i>L. intermedia</i> (♂/♀)	<i>L. neivai</i> (♂/♀)	<i>L. migonei</i> (♂/♀)	<i>L. forattinii</i> (♂/♀)	<i>L. cruzi</i> (♂/♀)	<i>L. fischeri</i> (♂/♀)	<i>L. lanei</i> (♂/♀)		
Saquarema	(130/300)		(0/30)						(130/330)
Rio Bonito	(80/270)								(80/270)
Além Paraíba	(110/300)								(110/300)
Corumbá				(60/140)	(120/130)				(180/270)
Porto Alegre		(1550/980)	(360/280)			(20/520)	(40/20)		(1970/1800)
Rio de Janeiro (capital)	(270/320)		(80/50)						(350/370)
Total	(590/1190)	(1550/980)	(440/330)	(60/140)	(120/130)	(20/520)	(40/20)		(2810/3340)

5.2 - Fase II: Os índices de infecção natural das espécies de flebotomos discriminadas na tabela anterior foram determinados, pela positividade do encontro de DNA de *Leishmania* spp nos grupos constituídos por 10 insetos fêmeas, através da metodologia de Hot-start PCR multiplex seguida de hibridização não-isotópica. De todas as áreas investigadas, foram gerados resultados positivos para infecção natural por *L. (V.) braziliensis*, apenas nos municípios do Rio de Janeiro e Porto Alegre, e em relação à *L. infantum chagasi* foram encontrados grupos de flebotomos positivos no município de Corumbá.

Vale ressaltar que em todos os ensaios de PCR multiplex conduzidos com as amostras de campo e analisados pela detecção do produto amplificado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, foi possível visualizar o produto de 220 pb, correspondente ao gene constitutivo *cacophony* específico para o gênero *Lutzomyia* (Figura 4). Além disso, as amostras de flebotomos machos que serviram como controle, revelaram-se negativas ao fragmento de 120 pb, equivalente à região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp, como esperado.

Os dados referentes à identificação da espécie de *Leishmania* encontrada, seu respectivo (ou potencial) vetor e o índice de infecção natural estimado, serão apresentados a seguir, em função de cada localidade estudada.

5.2.1 - Áreas de baixa endemicidade para leishmaniose tegumentar.

Nas localidades de Saquarema (RJ), Rio Bonito (RJ) e Além Paraíba (MG), não foram obtidos resultados positivos para infecção natural por *Leishmania* spp (Tabela 5). Todos os 90 grupos de fêmeas, com predominância de *Lu. intermedia*, não amplificaram a banda diagnóstica de 120 pb correspondente a região conservada do minicírculo do kDNA, assim como também não geraram sinal de hibridização com a sonda específica para o subgênero *Viannia*. Vale ressaltar que mesmo sendo áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar, a sonda para *L. infantum chagasi* também foi testada nas amostras submetidas à amplificação, confirmando a ausência de infecção por esta espécie de parasito, nos grupos de flebotomos amostrados. Todos os ensaios de PCR multiplex amplificaram a banda controle de 220 pb correspondente ao gene *cacophony* de flebotomos do gênero *Lutzomyia*, demonstrando a boa qualidade do DNA extraído e ausência de inibidores da reação de PCR.

Tabela 5: Resultados da análise por *PCR* multiplex e hibridização dos *grupos* de dez flebotomos fêmeas capturados em áreas de baixa endemicidade para LTA.

Localidades	Espécies			Grupos de fêmeas avaliados (<i>p</i> / <i>N</i>)
	<i>Lu. intermedia</i> (♂ / ♀)	<i>Lu. migonei</i> (♂ / ♀)	Total (♂ / ♀)	
Saquarema (RJ)	(13/30)	(0/3)	(13/33)	(0/33)
Rio Bonito (RJ)	(8/27)		(8/27)	(0/27)
Além Paraíba (MG)	(11/30)		(11/30)	(0/30)
Total	(32/87)	(0/3)	(32/90)	(0/90)

p: grupos positivos; *N*: grupos avaliados

5.2.2 - Detecção de *L. (Viannia) braziliensis* em flebotomos coletados em áreas endêmicas de LTA do município do Rio de Janeiro.

Os dados relacionados à análise de flebotomíneos das áreas estudadas do município do Rio de Janeiro estão apresentados na Tabela 6. Em termos de números absolutos de flebotomos coletados, a localidade de Colônia Juliano Moreira mostrou a maior densidade, seguida de Pau da Fome, Lameirão Pequeno e Cabuçú. Na área de Cachamorra não foi possível a coleta de fêmeas, apenas 10 machos de *Lu. migonei* foram capturados. Os insetos foram analisados em grupos de 10 flebotomos cada, pertencentes à mesma espécie, consistindo num total de 35 grupos de machos e 37 de fêmeas (Tabela 6). Grupos de fêmeas positivos foram evidenciados quando os produtos de PCR foram submetidos à hibridização com a sonda específica para o subgênero *Viannia*. Os resultados revelaram que oito de 37 grupos de fêmeas (21,6%) foram positivos, correspondendo ao sinal de detecção revelado na hibridização. Este índice de positividade foi relacionado exclusivamente à *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* coletados nas regiões de Colônia Juliano Moreira e Pau da Fome.

Dos 32 grupos de fêmeas de *Lu. intermedia* analisados, cinco foram positivos, sendo dois da localidade Pau da Fome e três provenientes de Colônia Juliano Moreira. Estes dados demonstraram uma positividade de 18,2% (2/11) e 18,8% (3/16) em cada localidade, respectivamente, revelando um índice total de positividade de 15,6% (5/32) para os grupos

analisados desta espécie. Quanto a *Lu. migonei*, os resultados indicaram que dos cinco *grupos* analisados, três (60%) mostraram-se positivos para o subgênero *Viannia*. Neste caso, o índice de positividade correspondente a cada localidade foi de 100% (1/1) para Colônia Juliano Moreira e de 50% (2/4) para Pau da Fome. Apesar do número limitado de *grupos* testados, a análise estatística relativa à percentagem de *grupos* positivos em ambas as localidades (4/15 para Pau da Fome e 4/17 para Colônia Juliano Moreira), indicou ausência de diferenças significativas entre as duas áreas estudadas ($p = 0,8379$). O mesmo foi observado quando analisamos em separado o índice de positividade para *Lu. intermedia* ($p > 0,05$) e *Lu. migonei* ($p > 0,05$) nestas mesmas áreas.

Se levarmos em consideração que cada *grupo* de dez flebótomos analisado continha pelo menos um inseto infectado (sensibilidade já demonstrada durante o desenvolvimento do ensaio de Hot-start PCR multiplex acoplado à hibridização não-radioativa; Pita Pereira et al., 2005), e considerando que 21,6% dos *grupos* foram positivos (8/37), podemos inferir que pouco mais de 2% dos flebótomos avaliados estavam infectados com *L. (V.) braziliensis*. Também constatamos que este percentual de infecção ocorreu nas duas localidades que apresentaram casos recentes de leishmaniose tegumentar.

Tabela 6: Resultados da análise por PCR multiplex e hibridização dos *grupos* de dez flebótomos fêmeas coletados em áreas de média endemicidade para LTA no município do Rio de Janeiro.

Localidade	Espécies			Grupos de fêmeas avaliados (p/N)
	<i>Lu.intermedia</i> (♂/♀)	<i>Lu. migonei</i> (♂/♀)	Total (♂/♀)	
Cabuçu	(2/2 ⁰)	-	(2/2)	(0/2)
Cachamorra	-	(1/0)	(1/0)	-
Pau da Fome	(3/11 ²)	(5/4 ²)	(8/15)	(4/15)
Colônia J. Moreira	(6/16 ³)	(2/1 ¹)	(8/17)	(4/17)
Lameirão Pequeno	(16/3 ⁰)	-	(16/3)	(0/3)
Total	(27/32⁵)	(8/5³)	(35/37)	(8/37)

p: grupos positivos; *N*: grupos avaliados; os números em “superscript” representam os grupos de fêmeas positivos relacionados a cada espécie de flebótomo

5.2.3 - Encontro de espécimes de *Lutzomyia (N.) neivai* e *Lu. fischerii* naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* em área periurbana do município de Porto Alegre.

Em Quinta do Portal, 98 grupos de fêmeas de *Lu. (N.) neivai* foram submetidos à análise molecular para pesquisa de infecção por *Leishmania* e 155 grupos de machos foram usados como controle negativo para a etapa de extração de DNA. Nesta localidade de Porto Alegre, foi possível visualizar em gel de agarose a 2% o fragmento amplificado de 120 pb correspondente à sequência conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, em 3 dos 98 grupos de fêmeas de *Lu. (N.) neivai* analisados. A hibridização com sonda biotilada específica para *Leishmania Viannia* confirmou a infecção com parasitos pertencentes a esse subgênero. Considerando que 3,1% dos grupos foram positivos e que cada um continha apenas um único inseto infectado, a taxa mínima de infecção para *Lu. (N.) neivai* foi estimada em 0,31%.

Seguindo a mesma abordagem molecular, foram avaliados 52 grupos de fêmeas de *Lu. fischerii* e identificados 2 desses com infecção por *L. (V.) braziliensis* (3,8%), representando assim um índice mínimo de infecção de aproximadamente 0,4% para essa espécie de flebótomo.

Para as demais espécies coletadas nesta localidade – *Lu. migonei* e *Lu. lanei*, não foi possível a identificação de infecção natural por *Leishmania* sp nos grupos de fêmeas analisados, constituindo em 28 e apenas 2 grupos, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados da análise por *PCR* multiplex e hibridização dos *grupos* de dez flebótomos fêmeas capturados em área com notificações de LTA no município de Porto Alegre.

Espécies	Número de grupos (♂ / ♀)	Grupos de fêmeas avaliados (p/N)
<i>Lu. neivai</i>	(155/98)	(3/98)
<i>Lu. migonei</i>	(36/28)	(0/28)
<i>Lu. fischerii</i>	(2/52)	(2/52)
<i>Lu. lanei</i>	(4/2)	(0/2)
Total	(197/180)	(5/180)

p: grupos positivos; *N*: grupos avaliados

5.2.4 - Detecção de infecção natural por *L. infantum chagasi* em *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* em uma área endêmica de leishmaniose visceral no município de Corumbá.

No bairro de Cristo Redentor, município de Corumbá, onde casos recentes de leishmaniose visceral humana e canina foram notificados, duas espécies de flebotomíneos foram identificadas como sendo as mais freqüentes: *Lu. cruzi* (55,6%), seguida por *Lu. forattinii* (44,4%).

Para ambas as espécies foram constituídos 18 *grupos* de dez insetos machos e 27 de fêmeas. Os grupos de fêmeas positivas foram confirmados para infecção por *L. infantum chagasi* após os produtos amplificados por *PCR* multiplex serem submetidos à hibridização com sonda espécie-específica biotinizada. Três dos 27 *grupos* (11,1%) de fêmeas geraram resultados positivos, sendo que dois deles eram formados por espécimes de *Lu. cruzi* e o outro de *Lu. forattinii*. Se considerarmos um único inseto infectado em cada um dos três grupos, as taxas de infecção mínima para *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* foram de 1,5 e 0,7%, respectivamente. O ensaio de *PCR* multiplex permitiu a visualização em gel de agarose do fragmento específico de 120 pb correspondente ao DNA de *Leishmania*, em um grupo positivo

de cada espécie de *Lutzomyia*, antes mesmo da etapa de hibridização para confirmação da espécie de parasito infectiva (Figura 4).

Tabela 8: Resultados da análise por *PCR* multiplex e hibridização dos grupos de dez flebótomos fêmeas capturados em área endêmica para LVA no município de Corumbá.

Espécies	Numero de grupos (♂ / ♀)	Grupos de fêmeas avaliados (p/N)
<i>Lu. cruzi</i>	(12/13)	(2/13)
<i>Lu. forattinii</i>	(6/14)	(1/14)
Total	(18/27)	(3/27)

p: grupos positivos; N: grupos avaliados

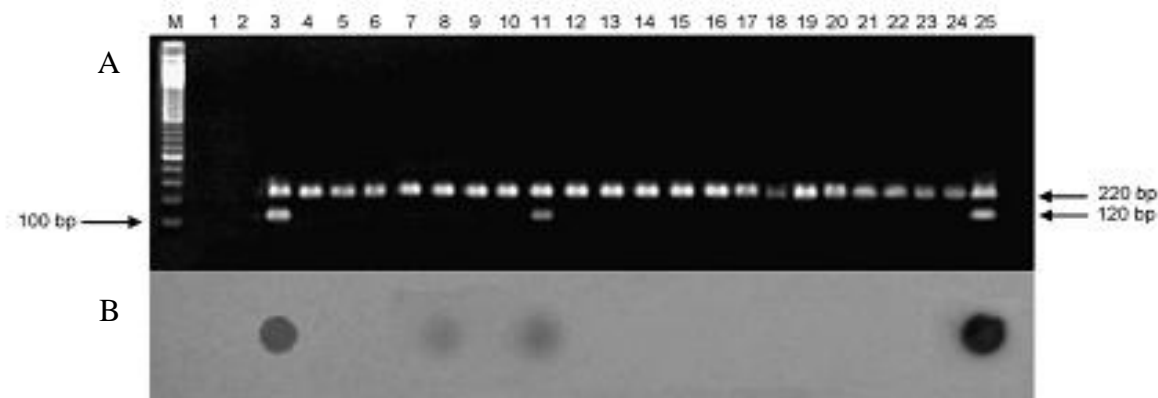


Figura 4. Detecção de *L. infantum chagasi* em *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* coletados no município de Corumbá. (A) Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, contendo os produtos amplificados pelo ensaio de *PCR* multiplex. O fragmento de 220 pb representa a amplificação do gene cacophony (gênero *Lutzomyia*); o fragmento de 120 pb corresponde à região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp. (M), marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder). Linhas 1 e 2, controles negativos da *PCR* (mistura da reação sem DNA); linha 3, grupo positivo de *Lu. forattinii*; linha 11, grupo positivo de *Lu. cruzi*; linhas 4 – 10 e 12 – 20 representam grupos de flebótomos não infectados; linhas 21- 24, controles negativos para a etapa de extração de DNA (grupos de insetos machos); linha 25, controle positivo da *PCR* (DNA extraído da mistura de grupo de inseto macho + promastigotas de *L. infantum chagasi*). **(B)** Resultado da hibridização com a sonda biotinizada específica para *L. infantum chagasi*. Após a hibridização, pôde ser evidenciado um segundo grupo de *Lu. cruzi* que se mostrou infectado por *L. infantum chagasi* (correspondente a linha 8).

5.3 - Fase III: Esta terceira fase foi constituída de todo o processo de padronização e validação da PCR em tempo real para a medida da carga parasitária por *Leishmania* sp nas amostras de flebótomos provenientes do campo. Após os testes de otimização da concentração e volume dos reagentes, foi definido o protocolo de reação a ser usado nos ensaios quantitativos, o qual consistiu em um volume final de reação de 15 µL, contendo 7,5 µL de tampão 2X Master mix – SYBR green ou Power SYBR green (Applied Biosystems), 2 pmol de cada primer, 2 µL de DNA e água ultra-pura para ajustar o volume (correspondente ao Mix 14 da Tabela 3). A termociclagem foi a mesma usada no ensaio de PCR convencional (multiplex), apenas acrescida do programa para a análise da curva de dissociação dos produtos amplificados, como descrito em Materiais e Métodos.

5.3.1 - Etapas de Padronização do ensaio de PCR em Tempo Real.

5.3.1.1 – Experimentos com parasitos clonados (*cell sorting*).

Com o intuito de avaliar a possibilidade de utilizarmos diluição de parasitos ou DNA como nossas amostras padrões, foram realizados experimentos onde comparamos os Cts de parasitos separados por citometro de fluxo, onde tinhamos certeza quanto ao numero de parasito por amostra e diluicoes seriadas de parasitos ($10^3 - 10^{-2}$). Os Cts obtidos pelos parasitos diluidos não apresentou diferenca estatisticamente significante dos Cts obtidos pelos parasitos clonados (Tabela 9)

Tabela 9: Comparacao dos Cts obtidos a partir da amplificação de amostras de parasitos clonados (*cell sorting*) e diluição de parasitos.

[] de parasitos	Ct parasitos clonados	Ct parasitos diluídos
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
10^{-2}	28,05	28,34
10^{-1}	26,01	25,74
1	21,98	22,03
10	20,02	19,87

10 ²	16,09	16,39
	<i>L. infantum chagasi</i>	
10 ⁻²	27,89	28,10
10 ⁻¹	26,09	25,89
1	19,87	19,73
10	17,20	17,45
10 ²	15,00	15,10

$P > 0,05$

5.3.1.2 - Otimização da curva padrão de calibração.

Foram testadas duas estratégias para obtenção do DNA a ser usado como amostras padrão (calibradores) para os ensaios quantitativos de determinação da carga parasitária de *Leishmania*, em experimentos com amostras reconstituídas, como descrito em Materiais e Métodos. Nessa fase da otimização, comparamos dois protocolos de extração de DNA (fenol-clorofórmio e minicolunas de sílica - kit comercial), assim como os dois sistemas disponíveis de PCR em tempo real que empregam o corante SYBR green (SYBR green e Power SYBR green). Em ambos os ensaios comparativos, a reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos na (i) quantificação do gene *cacophony* de flebótomos (no caso da comparação dos dois protocolos de extração de DNA – Quadro 1), e (ii) na quantificação de kDNA de *Leishmania* (no caso da comparação dos dois sistemas que empregam o corante SYBR green – Quadro 2).

(A) Diferentes concentrações de promastigotas de cultura de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), correspondendo a diluições de 10³ – 10⁻² células que foram adicionadas a um grupo constituído por 10 flebótomos machos.

Vários ensaios comparando a reprodutibilidade dos dois sistemas de SYBR green em relação aos dois protocolos de extração de DNA foram realizados, com a finalidade de selecionar, não apenas, o protocolo de recuperação de DNA das amostras de insetos que fornecesse uma extração mais homogênea, assim como de melhor pureza, como também o

sistema de SYBR green que gerasse uma maior eficiência de quantificação dessas amostras. Isso foi importante, pois como objetivamos a quantificação das amostras, quanto mais homogênea for a obtenção do DNA total a partir de lisados de 10 flebotomos, mais confiáveis serão os resultados da quantificação. Para avaliar estes parâmetros analisamos primeiro, os valores de Cts obtidos pela amplificação do gene *cacophony* (gene constitutivo do gênero *Lutzomyia*), a partir das extrações de DNA por fenol-clorofórmio e pelo kit comercial – colunas de sílica (Quadro 1).

Quadro 1: Valores de Cts obtidos através da amplificação do gene constitutivo (*cacophony*) de flebotomos a partir de amostras de DNA total extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio equivalentes às diluições em série (10^3 a 10^{-2}) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi* adicionadas a um grupo de 10 insetos machos. Os valores estão expressos como médias dos Cts das duplicatas (*cacophony*) em três experimentos independentes para o sistema SYBR green e Power SYBR green.

[] de parasitos + 10 flebotomos	Fenol (Ct)	Kit (Ct)
<i>L. braziliensis</i>		
10^{-2}	20,87	21,37
10^{-1}	21,38	21,79
1	19,97	21,54
10	20,07	21,89
10^2	21,65	21,86
10^3	20,50	21,47
<i>L. chagasi</i>		
10^{-2}	21,13	22,02
10^{-1}	20,32	22,34
1	20,75	22,97
10	19,76	22,24
10^2	21,60	22,70
10^3	21,15	22,54

[$p < 0,05$]

As análises estatísticas revelaram que a extração pelo kit comercial se mostrou mais eficiente, para nossos objetivos [$p < 0,05$], gerando uma maior reprodutibilidade da extração de DNA total dos lisados de 10 flebótomos contendo diferentes concentrações de células dos parasitos (valores de Cts mais homogêneos).

O próximo passo foi comparar o desempenho dos dois sistemas de PCR em tempo real (SYBR e Power SYBR green) para definirmos aquele que apresentasse uma maior sensibilidade para a detecção de DNA de *Leishmania*, nas amostras reconstituídas. Para isso, as mesmas amostras apresentadas no Quadro 1 foram avaliadas, só que desta vez comparamos os valores de Cts obtidos pela amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA para as duas espécies de *Leishmania*.

Quadro 2: Valores de Cts obtidos através da amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, utilizando os sistemas de detecção Power SYBR green e SYBR green a partir das amostras de DNA extraídas por kit comercial e fenol-clorofórmio equivalentes às diluições em série (10^3 a 10^{-2}) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi* adicionadas a um grupo de 10 insetos machos. Os valores estão expressos como médias dos Cts das duplicatas (kDNA) em três experimentos independentes para cada protocolo de extração de DNA.

[] de parasitos + 10 flebótomos	Power SYBR green (Ct)	SYBR Green (Ct)
<i>L. braziliensis</i>		
10^{-2}	27,07	32,04
10^{-1}	25,30	29,06
1	22,45	26,27
10	19,09	22,80
10^2	16,42	20,17
10^3	14,03	17,36
<i>L. chagasi</i>		
10^{-2}	28,09	30,22
10^{-1}	26,39	30,15
1	23,67	27,77

10	20,01	23,02
10 ²	17,87	21,31
10 ³	15,30	18,44

[$p < 0,05$]

Foi observado um melhor desempenho com o Power SYBR green, em termos de sensibilidade de detecção do kDNA, considerando que os valores de Cts referentes às diferentes concentrações de parasitos foram menores nas duas espécies de *Leishmania*, em relação aos valores revelados pelo sistema SYBR green [$p < 0,05$]. Para *L. (V.) braziliensis*, os Cts pelo Power SYBR green variaram de 27 (amostra mais diluída) à 14 (amostra mais concentrada), enquanto estas mesmas amostras revelaram Cts de 32 e 17, respectivamente, com o SYBR green. O mesmo foi visto em relação às diluições de *Leishmania infantum chagasi* (Power SYBR green com Cts variando de 28 à 15 e SYBR entre 30 à 18, representando as amostras mais diluídas e mais concentradas, respectivamente). Esses resultados foram reprodutíveis em todas as réplicas intra e inter-experimentos.

(B) Diferentes concentrações de DNA de *Leishmania*, obtidos de diluições seriadas de promastigotas (10^3 a 10^{-2}), misturados à uma concentração fixa correspondendo a 200 ng de DNA de lisado de flebótomos machos.

As amostras foram processadas como descrito acima, comparando os diferentes protocolos de extração de DNA - fenol/clorofórmio x kit comercial e os dois sistemas de detecção - SYBR x Power green.

Assim como observado nos experimentos anteriores (Quadro 2), os resultados confirmaram a maior sensibilidade do sistema de detecção por Power SYBR green em relação às diluições seriadas de DNA das duas espécies de *Leishmania* adicionadas à uma concentração fixa de DNA de flebótomos. Nestes ensaios, a comparação Power x SYBR green revelou diferenças de cerca de 4 ciclos (ou 4 Cts) a favor do sistema de detecção Power SYBR green. Também, como já verificado anteriormente (Quadro 1), a extração de DNA por colunas de sílica (kit comercial) mostrou uma recuperação do DNA mais eficiente, pois os Cts das amostras amplificadas do gene constitutivo *cacophony* não variaram como aqueles obtidos nas amostras de DNA extraídas por fenol-clorofórmio.

As curvas padrão geradas pelas amostras correspondentes às diluições seriadas de DNA de *Leishmania* misturadas ao DNA de flebótomos foram eficientes, mas quando comparadas ao outro experimento de reconstituição (diferentes concentrações de parasito + 10 insetos), a eficiência se mostrou um pouco inferior, o que foi importante para determinarmos quais amostras reconstituídas seriam as mais adequadas para serem usadas como padrões de calibração nos experimentos de quantificação de carga parasitária. Todos os resultados foram reproduzidos em réplicas intra e inter-experimentos.

5.3.1.3 - Análise das curvas padrão de calibração.

As curvas padrão de DNA geradas com amostras reconstituídas contendo diferentes concentrações de parasito (10^3 - 10^{-2}) adicionadas a um grupo de 10 insetos machos, extraídas por colunas de sílica (kit comercial) e utilizando o sistema de detecção Power SYBR Green, obtiveram uma excelente eficiência e reprodutibilidade tanto para *L. (V.) braziliensis* como para *Leishmania infantum chagasi* ($R^2 = 0,9992$ e $0,9975$, respectivamente) (Figura 5). Esses resultados foram importantes para definir a utilização dessas amostras como padrões de calibração para os experimentos de quantificação de carga parasitária em flebótomos provenientes das diferentes áreas estudadas. Em cada ensaio de quantificação, essas amostras eram processadas em paralelo as amostras diagnósticas para a correta correlação e posterior quantificação.

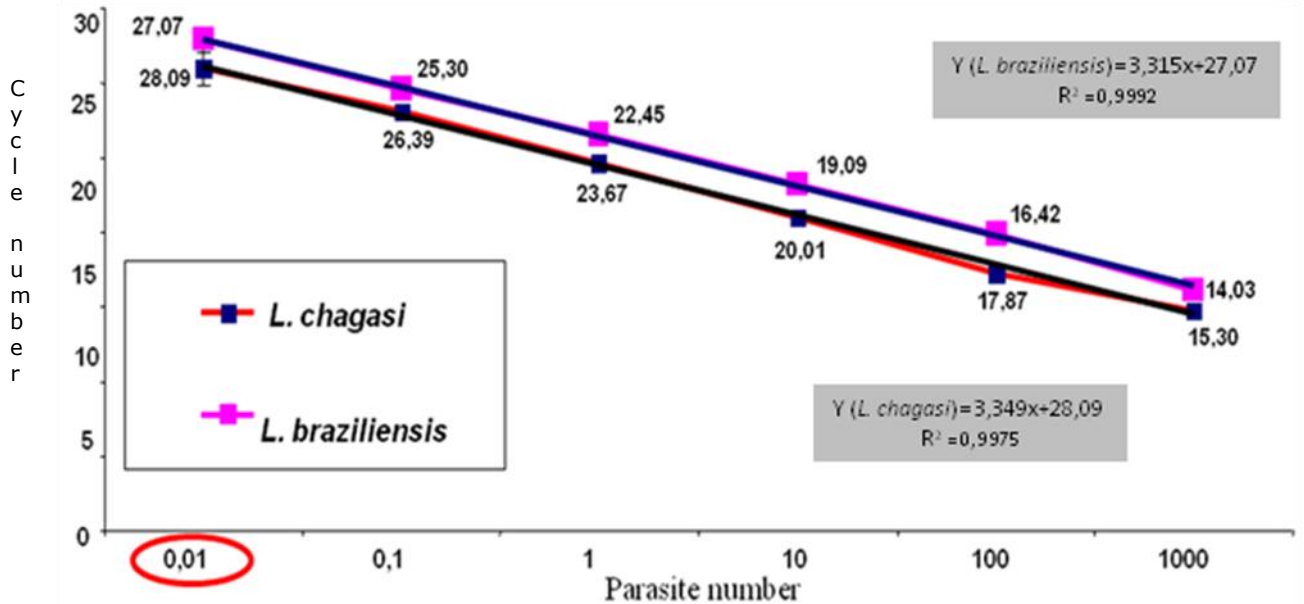


Figura 5 – Curvas padrão de calibração utilizando DNA extraído de amostras reconstituídas contendo diferentes concentrações de *L.(V.)braziliensis* e *L.(L.) chagasi* (10^3 - 10^{-2} células) adicionadas a um grupo de 10 insetos machos. No eixo X está representado o número de parasitos equivalente a cada diluição, em Y os valores de Ct (número de ciclos). O sistema Power SYBR green permitiu a detecção de kDNA equivalente à 10^{-2} células de ambas as espécies de *Leishmania*. As curvas foram obtidas com as médias dos Cts de três experimentos independentes. O cálculo da regressão linear foi determinado pela fórmula que representa a equação da reta: $y = ax + b$, onde (a) indica o coeficiente angular ou inclinação da reta e (b) indica o intercepto da reta (coeficiente linear). (R2) indica o coeficiente de correlação linear entre as concentrações (número de parasitos) e os Cts resultantes das ampliações do alvo kDNA.

5.3.1.4 - Interpretação dos resultados do sistema Power SYBR green: Análise das curvas de dissociação.

Nos experimentos de otimização do sistema de detecção que utiliza o corante SYBR green, esperávamos obter um único pico de dissociação correspondente ao produto amplificado de 120 pb da região conservada dos minicírculos do kDNA (apenas um valor de Tm - Temperatura de *melting* ou dissociação), pois trabalhamos com *primers* específicos para o gênero *Leishmania*. Porém ao analisarmos as curvas de dissociação para as duas espécies, *L. infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*, foram observados dois picos com valores

de T_m equivalentes a $80,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $79,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, os quais correspondiam aos produtos amplificados de cada espécie (Figura 6).

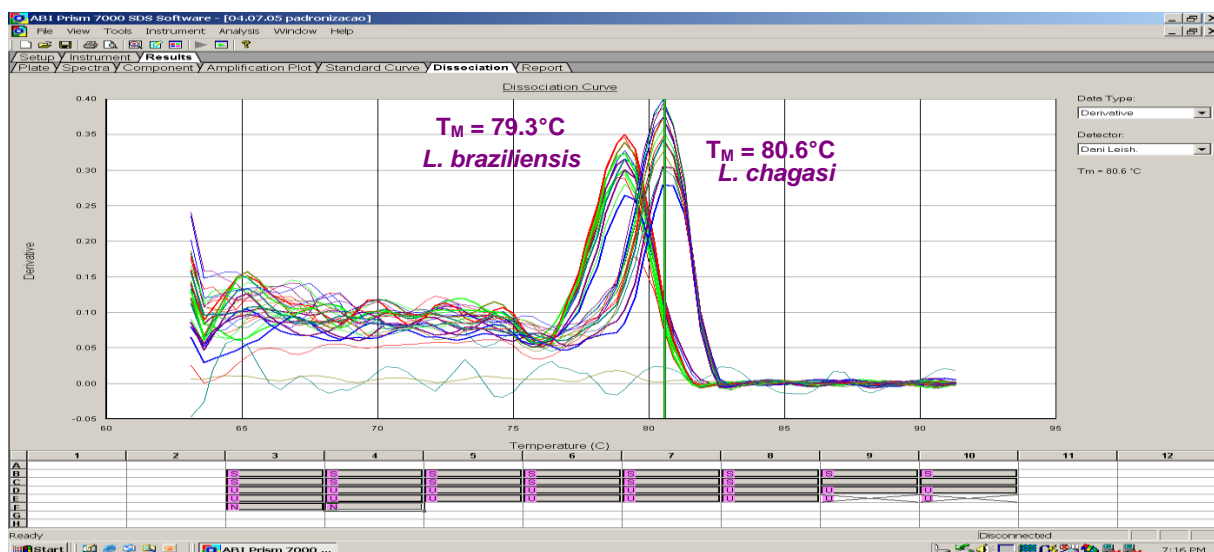


Figura 6: Curvas de dissociação dos produtos amplificados de *L. (V.) braziliensis* (esquerda) e *Leishmania infantum chagasi* (direita), com os respectivos valores de T_m . Na abcissa está indicada a variação de temperatura e na ordenada a derivativa de fluorescência.

Esses resultados demonstraram que a metodologia de SYBR green utilizando o alvo kDNA (região conservada dos minicírculos), possibilitou diferenciar espécies pertencentes aos dois subgêneros de *Leishmania*, através da curva de dissociação (distintos valores de T_m). Com o intuito de confirmar a identidade dos produtos gerados nas duas espécies de parasitos, novos ensaios foram realizados a partir de diluições de DNA isolado de ambas as espécies, para posterior clonagem e sequenciamento dos respectivos amplicons, como descrito em Materiais e Métodos.

Ensaios também foram realizados com DNA de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016 (subgênero *Leishmania*) e *L. shawi* MCEB/BR/1984/M8408 (subgênero *Viannia*) e observamos que o T_m obtido com os produtos amplificados de *L. amazonensis* era coincidente com aquele de *L. chagasi*, e o correspondente a *L. shawi* foi semelhante ao observado para *L. braziliensis* (Figura 7) Constatamos então que a metodologia de SYBR green permitiu distinguir entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, o que foi confirmado posteriormente, com a utilização de isolados de pacientes, com ambas as

formas da doença (LTA e LVA) em novos experimentos (MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14369-P, MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14578-P, MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14612-P). Todos os resultados foram reprodutíveis em pelo menos três experimentos independentes.

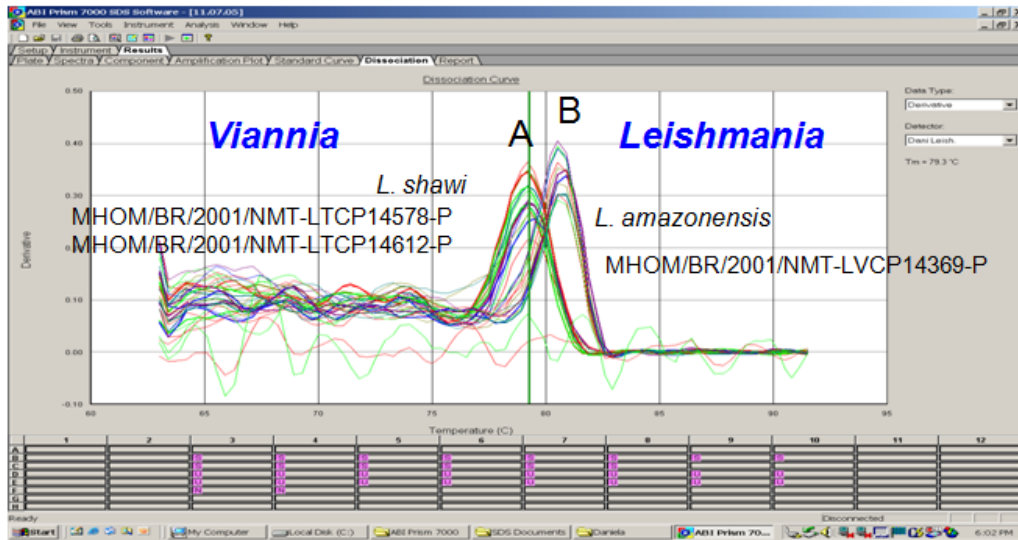


Figura 7: Curvas de dissociação dos produtos amplificados de *L. (V.) shawi* e isolados de pacientes LTA (esquerda) e *L. (L.) amazonensis* e isolados de pacientes LVA (direita), com os respectivos valores de T_m . Na abcissa está indicada a variação de temperatura e na ordenada a derivativa de fluorescência

5.3.1.5 - Sequenciamento dos amplicons correspondentes à região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp.

Os produtos amplificados com os iniciadores senso: (G/C)(G/C)(C/5G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC e antisense: GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA, a partir das quatro espécies de *Leishmania* estudadas foram clonados e sequenciados. As sequências geradas foram alinhadas, editadas e formatadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) (Figura 8). Ressalta-se que na figura não estão demonstrados os iniciadores posicionados nas extremidades 5' e 3' das seqüências geradas.

```

[           1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#Lchagasi4  AATGGAAAAA TG-GCTGCAG AATCCCGTT CA--AAAATC GCCGGAAAAT GCCAAAATC
#Lchagasi9  ..... -..... -.....
#Lchagasi11 ..... -.....
#Lshawii1   ...C..... GCA.A... ..C..... ..AAT....A .C.C..... CA.GTTTT.T
#Lshawii2   .T.C..... GCA.A... ..C..... ..A--....A CC.C..... CA.GTTTT.T
#Lshawii3   .T.C...TT. GCA.A... ..C..... ..AAT....A .C.C..... CG.T.TTT.T
#Lamazonensis1 .TCC.G... GTGA..... ..C..... --T..T.T A.G...TTT. CGGG..TTCC
#Lamazonensis2 .TCC.G... ATGA..... ..C..... --T..T.T CC.CA...A C..G...T..
#Lamazonensis3 TTG.CG... ATGA..... ..C..... --T..T.T A.G...TTC .GGG..T..
#Lbraziliensis1 .TC.C..... GCA.A... ..C..... -A-.... CC.CA...T. CG.GTTTT.T
#Lbraziliensis2 .TC.-..... GCA.A... ..C..... -A-.... CC.CA...T. CG.T.TTT.T
#Lbraziliensis4 .T.C..... GCA.A... ..C..... ..AA-....- .C.C..... CG.T.TTT.T
[ 6666666667 7777777778 ]
[ 1234567890 1234567890 ]
#Lchagasi4  GCCTCCGAGC CGGGAAACTC
#Lchagasi9  .....
#Lchagasi11 .....
#Lshawii1   ...CT.CCC. T.CAC..T.A
#Lshawii2   ...CT.CCC. T.CAC..T.A
#Lshawii3   ...CT.CCC. T.CAC..T.A
#Lamazonensis1 .....G&GC. GT.....
#Lamazonensis2 .....G..C. GTC&C....
#Lamazonensis3 .....GC. GT.....
#Lbraziliensis1 ...CT.CCC. T.CAC..T.A
#Lbraziliensis2 ..CT.CCC. T.CAC..T.A
#Lbraziliensis4 ...CT.CCC. T.CAC..T.A

```

Figura 8: Alinhamento das 12 sequencias obtidas referentes às quatro espécies de *Leishmania* estudadas. Em vermelho: exemplos de diferenças fixas entre as sequencias das cepas dos dois sub-generos (*Leishmania* e *Viannia*), que justifica as diferentes temperaturas na curva de dissociação dos produtos amplicados.

A partir dessas seqüências foi construída a árvore com o programa MEGA 3.1 (Kumar et al, 2004), utilizando o método Neighbor-Joining com a distância de Kimura-2-parâmetros, o que permitiu correlacionar as distintas cepas de *Leishmania*. As seqüências das cepas avaliadas foram agrupadas de forma condizente com a sua classificação. Nota-se, por exemplo, que as seqüências das cepas pertencentes ao subgênero *Viannia* foram agrupadas com um alto valor de bootstrap equivalente a 100% (Figura 9).

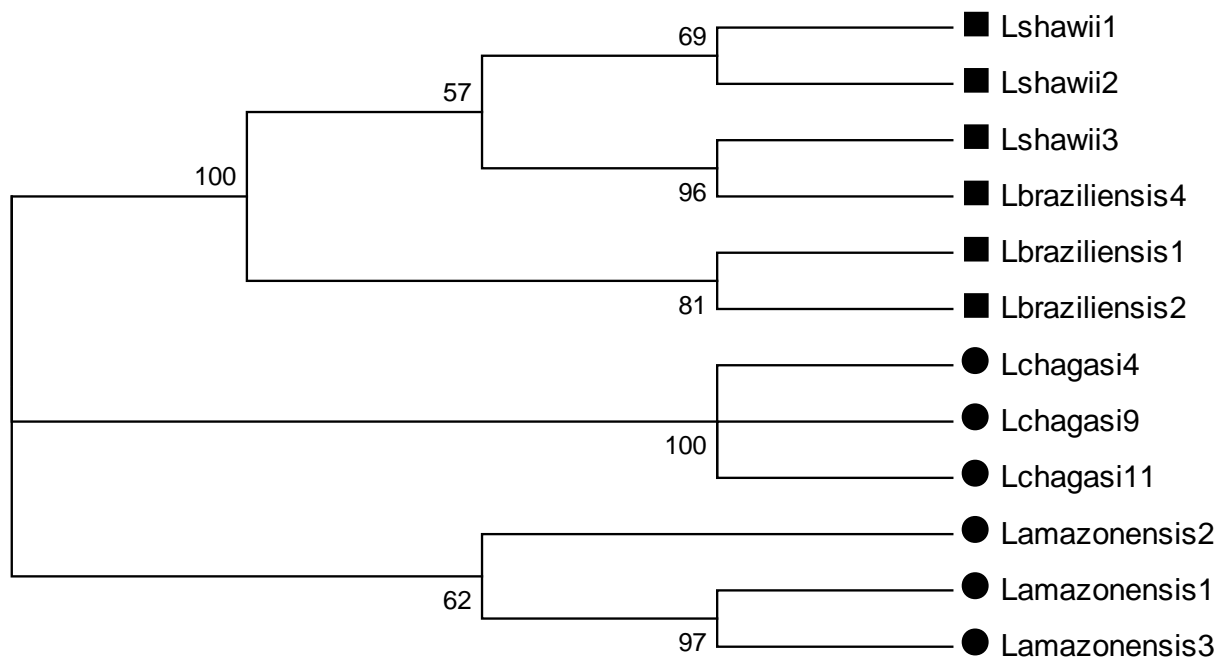


Figura 9. Árvore obtida a partir do sequenciamento da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp, onde ■ representa as sequências do subgênero *Viannia* e ● aquelas representativas do subgênero *Leishmania*.

Os resultados do sequenciamento demonstraram a existência de sítios polimórficos na sequência conservada dos minicírculos do kDNA. As cepas do sub-genero *Viannia* apresentam alguns sítios polimórficos compartilhados, o que justifica o seu agrupamento na árvore. Em relação as sequências do subgênero *Leishmania*, não houve este agrupamento, porém as sequências das espécies foram agrupadas de forma adequada.

5.3.2. Validação do Sistema de PCR Power SYBR green para estimativa da carga parasitária de flebótomos.

Para a validação da metodologia utilizamos as amostras de DNA extraído dos *grupos* de 10 flebótomos, provenientes das áreas onde obtivemos resultados positivos quanto à infecção natural por *Leishmania*. Estas áreas foram: Rio de Janeiro (capital), Porto Alegre e Corumbá. Para os ensaios de quantificação utilizamos uma amostragem dos *grupos* de fêmeas e machos de cada uma dessas localidades, os quais apresentaram valores de Ct para o gene de flebótomo (*cacophony*) dentro do intervalo de confiabilidade. Para as amostras de

cada área estudada, fizemos duplicatas intra-experimento de cada amostra (padrão de calibração e diagnóstica) e três réplicas inter-experimentos, para obtermos as médias dos Cts referentes ao gene *cacophony* e ao kDNA de *Leishmania*.

O intervalo de confiabilidade foi obtido através do cálculo das médias e erro padrão dos valores de Ct do gene *cacophony*, obtidos das réplicas inter e intra-ensaios para as três áreas estudadas.

$$\text{IC 95\% Médias} = \text{Média} \pm 2,571 * \text{EP(Erro Padrão)}$$

5.3.2.1 - Análise das amostras de Corumbá.

Na Tabela 10 estão representadas as 21 amostras diagnósticas (*grupos* de 10 flebótomos fêmeas) de *Lu. cruzi* e *Lu. foratirii*, além dos *grupos* de machos controles capturados em Corumbá que foram analisados por PCR em tempo real. Dos 27 *grupos* de fêmeas previamente analisados para infecção natural pelo ensaio de PCR multiplex seguido de hibridização. 21 apresentaram médias dos valores de Ct para o gene *cacophony* dentro do intervalo de confiabilidade (IC 95%), isto é Cts entre 19,89496 e 21,79837, e portanto foram selecionados para os ensaios quantitativos de carga parasitária.

Tabela 10: Resultados obtidos com o ensaio de PCR em tempo real - sistema Power SYBR Green, a partir dos *grupos* de dez flebótomos fêmeas (amostras diagnósticas) capturados em área endêmica para LVA no município de Corumbá. Os resultados estão expressos como média dos Cts em três experimentos independentes.

Amostras Diagnósticas	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número de parasitos)
<i>Lu. cruzi</i>			
Amostra 1*	20,07	17,02	100
Amostra 2*	21,65	16,86	100
Amostra 3	21,44	38,06	-
Amostra 4	20,98	39,00	-
Amostra 5	21,07	39,29	-
Amostra 6	21,32	38,76	-

Amostra 7	21,04	38,09	-
Amostra 8	21,54	38,67	-
Amostra 9	20,88	39,69	-
Amostra 10	21,02	38,33	-
<i>Lu. Foratinii</i>			
Amostra 11*	21,33	17,93	100
Amostra 12	21,49	39,37	-
Amostra 13**	21,06	20,03	10
Amostra 14	21,32	38,98	-
Amostra 15	21,04	39,00	-
Amostra 16	21,53	39,77	-
Amostra 17	20,88	39,06	-
Amostra 18	21,02	39,47	-
Amostra 19**	21,33	22,00	1
Amostra 20	21,49	39,34	-
Amostra 21	21,07	38,78	-
<i>Machos controles</i>			
Amostra 22	21,32	39,44	-
Amostra 23	21,03	39,87	-
<i>Controles Positivos</i>			
DNA <i>L. chagasi</i>	21,33	14,28	1000
DNA <i>L. braziliensis</i>	21,11	14,05	1000
<i>Amostras Padrão</i>			
<i>L. chagasi</i> (diluições)			

10 ⁻²	21,45	28,15	0,01
10 ⁻¹	21,12	26,05	0,1
1	21,21	23,52	1
10	21,29	20,10	10
10 ²	21,57	17,50	100
10 ³	21,02	15,06	1000
Amostras Padrão			
<i>L. braziliensis</i> (diluições)			
10 ⁻²	21,66	27,15	0,01
10 ⁻¹	21,48	25,07	0,1
1	21,09	22,62	1
10	21,37	19,70	10
10 ²	21,87	16,40	100
10 ³	21,88	14,06	1000

Amostras 1 a 10: Fêmeas *Lu. cruzi*, Amostras 11 a 21: Fêmeas *Lu. foratinii*, Amostras 22 e 23: Machos controles, Controles positivos: DNAs de *L. chagasi* e *L. braziliensis*.

*Amostras previamente positivas pela PCR multiplex + Hibridização

**Amostras positivas apenas por PCR em tempo real

Um total de cinco grupos, sendo dois de *Lu. cruzi* (amostras 1 e 2) e três de *Lu. foratinii* (amostras 11, 13 e 19) apresentaram sinal de fluorescência acima do basal (*threshold*) e foram positivos para quantificação de carga parasitária. As duas amostras de *Lu. cruzi* foram quantificadas com cerca de 100 parasitos cada e as demais amostras dessa espécie mantiveram-se negativas, corroborando os dados previamente obtidos por PCR convencional multiplex seguido de hibridização para os grupos de fêmeas de *Lu. cruzi* capturados em Corumbá.

Em relação à *Lu. foratinii*, o ensaio de PCR em tempo real permitiu a detecção de dois novos grupos (amostras 13 e 19), contendo cerca de 10 e 1 parasitos, respectivamente, os quais não foram detectados pela análise qualitativa prévia. Por outro lado, foi estimada uma

carga de 100 parasitos na amostra 11, a qual também foi positiva para infecção por *L. (L.) infantum chagasi* através de PCR multiplex e hibridização.

A análise da curva de dissociação dos produtos amplificados correspondentes à região conservada dos minicírculos de kDNA, revelou um perfil correspondente ao de *Leishmania infantum chagasi* nas cinco amostras diagnósticas positivas, confirmando assim os resultados prévios de hibridização. Apesar de terem sido evidenciados valores de Ct para o kDNA < 40 nas amostras diagnósticas negativas, machos controles e controles negativos da reação (NTC – mistura da reação sem DNA), a análise da curva de dissociação revelou que o sinal basal de fluorescência dessas amostras foi devido à ocorrência de dímeros de *primers*, descartando assim a possibilidade de contaminação.

5.3.2.2 – Análise das amostras de Porto Alegre.

O intervalo de confiabilidade das médias dos Cts correspondentes ao gene *cacophony* variou de 20,96849 a 21,91818, em 20 amostras selecionadas de *Lu. neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. fischerii* e *Lu. lanei* provenientes da área estudada em Porto Alegre. Os cinco *grupos* positivos para infecção por *L. (V.) braziliensis* detectados pelo ensaio qualitativo de PCR multiplex seguido de hibridização (3 *grupos* de *Lu. neivai* e 2 de *Lu. fischerii*), apresentaram valores da média dos Cts de flebótomo dentro desse intervalo, e a estimativa da carga parasitária nessas amostras está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados obtidos com o ensaio de *PCR em tempo real* - sistema Power SYBR Green, a partir dos *grupos* de dez flebótomos fêmeas (amostras diagnósticas) capturados em área com notificação de casos de LTA no município de Porto Alegre. Os resultados estão expressos como média dos Cts em três experimentos independentes.

Amostras Diagnósticas	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número de parasitos)
<i>Lu. neivai</i>			
Amostra 1*	20,98	15,92	100
Amostra 2*	21,33	16,06	100
Amostra 3*	21,04	20,06	10
Amostra 4	21,75	39,00	-

Amostra 5	21,87	39,29	-
Amostra 6	21,70	38,76	-
<i>Lu. migonei</i>			
Amostra 7	21,10	38,39	-
Amostra 8	21,45	39,47	-
Amostras Diagnósticas	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número de parasitos)
Amostra 9	21,90	39,89	-
Amostra 10	21,53	38,53	-
Amostra 11	21,77	39,43	-
Amostra 12	21,65	39,78	-
<i>Lu. fischerii</i>			
Amostra 13*	21,69	20,01	10
Amostra 14*	21,40	17,78	100
Amostra 15	21,10	39,00	-
Amostra 16	21,03	39,89	-
Amostra 17	20,99	39,00	-
Amostra 18	21,62	39,87	-
<i>Lu. lanei</i>			
Amostra 19	21,66	38,00	-
Amostra 20	21,51	39,13	-
<i>Machos Controles</i>			
Amostra 21	21,80	39,15	-
Amostra 22	21,84	39,39	-
<i>Controles Positivos</i>			

DNA <i>L. chagasi</i>	21,13	14,13	1000
DNA <i>L. braziliensis</i>	21,19	14,25	1000
Amostras Padrão			
<i>L. chagasi</i> (diluições)			
10 ⁻²	21,30	28,39	0,01
Amostras Diagnósticas	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número de parasitos)
10 ⁻¹	21,15	26,11	0,1
1	21,43	23,50	1
10	21,33	20,00	10
10 ²	21,27	17,21	100
10 ³	21,51	15,54	1000
Amostras Padrão			
<i>L. braziliensis</i> (diluições)			
10 ⁻²	21,65	28,01	0,01
10 ⁻¹	21,43	26,00	0,1
1	21,22	22,02	1
10	21,41	19,20	10
10 ²	21,32	16,50	100
10 ³	21,58	14,20	1000

Amostras 1 a 6: Fêmeas *Lu. neivai*, Amostras 7 a 12: Fêmeas *Lu. migonei*, Amostras 13 a 18: Fêmeas *Lu. fischerii*, Amostras 19 e 20: Fêmeas *Lu. lanei*, Amostras 21 e 22: Machos controles, Controles positivos: DNAs de *L. chagasi* e *L. braziliensis*.

*Amostras previamente positivas pela PCR multiplex + Hibridização

Foi estimada uma concentração de cerca de 100 parasitos em dois grupos correspondentes à *Lu. neivai* e um de *Lu. fischerii*. Além desses, um grupo de fêmea de cada espécie continha 10 parasitos. As outras espécies analisadas (*Lu. migonei* e *Lu. lanei*) se mantiveram negativas, assim como os controles de amostras de machos. Como já

mencionado, todas as amostras negativas (fêmeas, machos e NTC) que apresentaram valores de Ct em torno de 39, nas quais um pequeno sinal de fluorescência foi detectado, a análise da curva de dissociação demonstrou que se tratava de dímeros de primers. Os cinco *grupos* de fêmeas que foram positivos nos ensaios quantitativos revelaram valores de Tm para a região conservada dos minicírculos de kDNA correspondentes à dissociação dos produtos de *L. (V.) braziliensis*, confirmando os resultados qualitativos obtidos pela PCR multiplex e hibridização.

5.3.2.3 – Análise das amostras do município do Rio de Janeiro.

As amostras provenientes do Rio de Janeiro que foram submetidas à quantificação eram de quatro áreas distintas ao redor do Maciço da Pedra Branca. O intervalo de confiabilidade obtido a partir das médias dos Cts do gene *cacophony* foi de 21,68815 a 22,13851. A partir deste intervalo, foram selecionados 16 *grupos* de fêmeas de *Lu. intermedia* (2 de Cabuçu, 6 de Pau da Fome, 6 de Colônia Juliano Moreira e 2 de Lameirão Pequeno) de um total de 32 analisados previamente, os quais foram capturados nas áreas de média endemicidade para LTA. Para as análises quantitativas foi descartado um *grupo* que tinha apresentado resultado positivo para infecção natural por *L. (V.) braziliensis* na PCR multiplex e hibridização, proveniente de Colônia Juliano Moreira, pois essa amostra apresentou médias do Ct do gene *cacophony* fora do intervalo de confiabilidade (Tabela 12).

Todos os cinco *grupos* de fêmeas de *Lu. migonei* capturados (4 em Pau da Fome e 1 em Colônia Juliano Moreira), puderam ser incluídos nos ensaios para estimativa de carga parasitária. A Tabela 12 mostra os resultados das análises quantitativas nas quatro localidades estudadas.

Tabela 12: Resultados obtidos com o ensaio de *PCR em tempo real* - sistema Power SYBR Green, a partir dos *grupos* de dez flebótomos fêmeas (amostras diagnósticas) capturados em quatro localidades de média endemicidade para LTA do município do Rio de Janeiro. Os resultados estão expressos como média dos Cts em três experimentos independentes.

Amostras Diagnósticas/Área de origem	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número parasitos)
<i>Lu. intermedia</i>			
<i>Cabuçu</i>			
Amostra 1	21,72	38,02	-
Amostra 2	21,69	38,56	-
<i>Pau da Fome</i>			
Amostra 3*	21,84	20,03	10
Amostra 4*	22,00	21,02	10
Amostra 5	21,96	39,12	-
Amostra 6	21,82	38,99	-
Amostra 7	21,77	38,78	-
Amostra 8	21,74	39,23	-
<i>Colônia J Moreira</i>			
Amostra 9*	22,08	19,90	10
Amostra 10*	21,69	20,43	10
Amostra 11	21,73	38,93	-
Amostra 12	21,69	39,29	-
Amostra 13	21,76	39,87	-
Amostra 14	21,89	39,08	-
<i>Lameirão Pequeno</i>			
Amostra 15	22,04	39,80	-

Amostra 16	22,13	39,79	-
<i>Lu. migonei</i>			
<i>Pau da Fome</i>			
Amostra 17*	21,98	20,10	10
Amostra 18*	22,02	19,88	10
Amostra 19	22,03	38,87	-
Amostra 20	21,79	39,45	-
<i>Colônia J. Moreira</i>			
Amostra 21*	21,97	19,85	10
Amostras Diagnósticas/Área de Origem	Ct <i>cacophony</i> Flebótomo	Ct kDNA <i>Leishmania</i>	Quantificação (número parasitos)
<i>Machos Controles</i>			
Amostra 22	21,99	39,79	-
Amostra 23	21,93	39,86	-
<i>Controles Positivos</i>			
DNA <i>L. chagasi</i>	22,08	15,20	1000
DNA <i>L. braziliensis</i>	22,12	14,30	1000
<i>Amostras Padrão</i>			
<i>L. chagasi</i> <i>(diluições)</i>			
10 ⁻²	21,71	28,20	0,01
10 ⁻¹	21,96	26,40	0,1
1	21,69	23,70	1
10	21,82	20,27	10
10 ²	21,70	18,07	100

10 ³	21,90	15,60	1000
Amostras Padrão			
L. braziliensis (diluições)			
10 ⁻²	22,07	27,37	0,01
10 ⁻¹	22,09	25,84	0,1
1	22,12	22,65	1
10	22,13	19,01	10
10 ²	22,11	16,40	100
10 ³	21,99	14,35	1000

Fêmeas *Lu. intermedia*: Amostras 1 e 2 (Cabuçu), Amostras 3 a 8 (Pau da Fome), Amostras 9 a 14 (Colônia J Moreira), Amostras 15 a 16 (Lameirão Pequeno); Fêmeas *Lu. migonei*: Amostras 17 a 20 (Pau da Fome) e Amostra 21 (Colônia J Moreira); Machos controles: Amostras 22 e 23; Controles positivos: DNAs de *L. chagasi* e *L. braziliensis*.

*Amostras previamente positivas pela PCR multiplex + Hibridização

As sete amostras que apresentaram sinal de fluorescência acima do *threshold* (quatro de *Lu. intermedia* e três de *Lu. migonei*) apresentaram a mesma carga parasitária, próxima a 10 parasitos. Todas as amostras negativas para a metodologia do PCR multiplex se mantiveram negativas na quantificação, assim como as amostras controle de machos. As amostras controle positivo (DNA extraído de promastigotas de *L. chagasi* e *L. braziliensis*) foram quantificadas em cerca de 1000 parasitos.

Todas as amostras positivas apresentaram um Tm na curva de dissociação para *L. (V.) braziliensis*, confirmando os resultados prévios da hibridização. Novamente, os valores de Cts elevados para o kDNA (entre 38,02 e 39,86) das amostras negativas (fêmeas negativas, machos e NTC), foram devido à ocorrência de dímeros de primers, segundo às análises das curvas de dissociação destas amostras.

A comparação dos resultados da quantificação de carga parasitaria entre as diferentes espécies de flebótomos em cada área estudada, mostrou:

No município de Corumbá houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando avaliamos carga parasitária entre as duas espécies positivas para infecção natural,

sendo que *Lu. cruzi* apresentou um maior número de parasitos por *grupo* de 10 flebótomos , quando comparado a *Lu. foratinii*.

Em Porto Alegre obtivemos um resultando semelhante a Corumbá, sendo que *Lu. neivai* apresentou uma maior carga parasitária comparada aos *grupos* de 10 fêmeas de *Lu. fischeri* ($p < 0,05$).

No município do Rio de Janeiro não houve diferença estatisticamente significativa entre os *grupos* de *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* coletados em Pau da Fome já em Colônia Juliano Moreira , obtivemos diferenças estatisticamente significantes em relação a carga parasitária entre essas duas espécies ($p > 0,05$).

Comparamos também a distribuição de carga parasitária dos flebótomos em relação às diferentes áreas estudadas. Foi evidenciado que o município de Corumbá, considerado área de alta endemicidade de leishmaniose visceral, mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado com as áreas de média endemicidade para leishmaniose tegumentar do município do Rio de Janeiro.

No entanto, quando avaliamos as amostras coletadas em Corumbá em relação àquelas provenientes de Porto Alegre (área de baixa endemicidade para LTA), não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$).

6. Discussão

Um importante passo na incriminação de vetores das leishmanioses é o relatório da ocorrência de flebótomos naturalmente infectados (Killick-Kendrick & Ward 1981), pois na maioria dos estudos epidemiológicos, o conhecimento preciso do parasito e suas respectivas espécies vetoras resultam em uma intervenção mais eficiente e adequada nas áreas endêmicas, ampliando assim as possibilidades de elaborar planos de controle mais efetivos para a doença.

Embora a dissecação do tubo digestório do flebotomíneo seja ainda o método mais comumente utilizado para diagnosticar a infecção natural em áreas endêmicas, o processo é laborioso, demorado e requer extrema habilidade técnica. Outro fator limitante é a dificuldade do processamento de um grande número de amostras, o que se torna necessário para estudos epidemiológicos para se ter uma valiação satisfatória (Aransay et al., 2000; Perez et al., 2007). Alternativamente, ferramentas moleculares permitem a detecção de DNA de um único parasito *Leishmania* (Pita-Pereira et al., 2005) e representam um instrumento diagnóstico mais sensível do que dissecação seguida de microscopia (Nascimento et al., 2007). Em casos onde a presença de parasitos infectando flebótomos é escassa, este procedimento clássico pode fornecer resultados falso-negativos, revelando assim, taxas de infecção bem mais baixas do que a realidade. Além disso, a positividade obtida pelo exame microscópico necessita ser confirmada através da cultura dos parasitos *in vitro* e/ou por inoculação em animais de laboratório, já que outros flagelados além da *Leishmania* podem ser comumente encontrados no intestino do flebotomíneo (Ryan & Brazil, 1984; Freitas et al., 2002).

Um diagnóstico acurado e de boa sensibilidade, e que permita a correta identificação do parasito é necessário para distinguir espécies que se sobrepõem geograficamente, possibilitando assim condutas apropriadas para o controle da doença. A utilização da PCR para detecção da presença do DNA de *Leishmania* em insetos flebotomíneos tem se revelado de grande utilidade na identificação de possíveis vetores de leishmanioses em diferentes áreas geográficas (Grunewald e Silva, 1999; Aransay et al., 2000, Miranda et al., 2002; Perez et al., 2007). As principais vantagens dos métodos moleculares são sua alta sensibilidade e especificidade, independente do número, fases e localização do parasito no trato digestório do inseto (Perez et al., 1994).

É importante ressaltar que a capacidade vetorial das espécies de flebotomíneos é possivelmente um fator regulado por questões de ordem físico e fitogeográfica, uma vez que o meio ambiente de cada região pode influenciar na melhor adaptação de uma determinada espécie; o que por sua vez, pode determinar a predominância de uma espécie sobre outra (Lainson 1983). Temos como exemplo uma área endêmica de LTA na Venezuela, onde *Lu. migonei* assume a posição de principal transmissor da LTA, enquanto que *Lu. intermedia* representa o vetor secundário (Feliciangeli, 1988, 1991; Añez et al., 1989). Em localidades da região sudeste do Brasil esta situação se inverte. Neste caso, a hipótese que vigora é que *Lu. intermedia* seria o principal transmissor da LTA em humanos, enquanto que *Lu. migonei* estaria atuando como vetor secundário (Ferreira et al., 2001; Rangel et al. 1986; Pita-Pereira et al 2005).

No Brasil, *Lu. longipalpis* tem sido incriminado como vetor da leishmaniose visceral em quase todas as áreas em que esta doença tem sido relatada. Em Corumbá, Galati (1997) realizou inquérito flebotomíneo na região, devido à notificação de casos humanos de LVA e da presença de cães com aspecto sugestivo da doença. As espécies dominantes encontradas foram *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, com pequenas variações sazonais. As duas espécies foram coletadas no peridomicílio e no interior das moradias. A elevada antropofilia de ambas as espécies levou à sugestão das mesmas estarem participando da transmissão da doença em Corumbá, bem como a afinidade taxonômica dessas espécies com *Lu. longipalpis* (Galati 2003).

Posteriormente, Santos et al. (1998), utilizando a metodologia clássica para inferir taxa de infecção de espécimes de *Lu. cruzi* coletados em Corumbá, incriminaram essa espécie como vetor de LVA na região; a partir de um total de 3.575 fêmeas dissecadas, 14 foram diagnosticadas como infectadas por promastigotas de *Leishmania* (0,39%), tendo sido posteriormente caracterizada como *Leishmania infantum chagasi*.

Através de nossos resultados empregando ensaios de PCR multiplex e hibridização, pôde-se reafirmar a importância de *Lu. cruzi* como principal espécie vetora de LVA em Corumbá (2 grupos de 13 infectados com *L. infantum chagasi*), além de sugerir o papel de *Lu. forattinii* como possível transmissora da doença na região (Tabela 7), corroborando estudos anteriores de dissecação, na mesma localidade, onde foi observada infecção de *Lu. forattinii*

por flagelados (Brazil et al., 2002). Estas evidências combinadas com resultados prévios obtidos em Corumbá reforçam a importância de ambas as espécies de flebotomíneos no ciclo epidemiológico da LVA nessa região do Brasil, e confirmam o papel vetorial de *Lu. cruzi* na transmissão de *L. infantum chagasi*, bem como fornecem um novo dado acerca da capacidade vetorial de *Lu. forattinii*.

Em relação à outra área investigada, município de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, salientamos que pouco ainda se conhece sobre a eco-epidemiologia da LTA como um todo, sendo escassos os estudos sobre a fauna flebotomínea local, devido principalmente à inexistência de casos autóctones de leishmanioses no Estado até o início do ano 2000. Dados epidemiológicos comprovam que os casos de LTA ocorreram no perímetro urbano de Porto Alegre, em bairros com matas residuais (Santos et al., 2005). Tais locais têm características de zona rural, com criação de animais e plantações de hortifrutigranjeiros, com mata nativa nas proximidades das casas. Além disso, devemos considerar que o crescente processo de expansão da cidade, nos últimos anos, ocorreu em direção a essas áreas silvestres remanescentes, com conseqüente desmatamento e preparação de lotes de terra. Além da construção de condomínios, a região teve invasões e assentamentos em propriedades municipais. De acordo com Gonçalves (2003), nos bairros Lomba do Pinheiro e Restinga, local de ocorrência de um dos casos registrados para o município, foram identificadas as seguintes espécies: *Lu. neivai*, *Lu. fischeri*, *Lu. migonei*, *Lu. lanei*, *Lu. monticola*, *Lu. gaminarai* e *Brumptomyia nitzulescui*.

Estudo epidemiológico realizado pela Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de Porto Alegre, sugeriu *Lu. neivai* como principal vetor de LTA no município, por sua ocorrência e densidade em áreas de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, porém sem haver confirmação diagnóstica (Gonçalves 2003). Este fato foi confirmado através dos resultados no presente trabalho, onde foi detectada infecção natural de *Lu. neivai* por *L.(V.) braziliensis*. De um total de 98 grupos de fêmeas avaliados, três foram positivos (3,1%) no ensaio de PCR multiplex seguido de hibridização (Tabela 7). Outro resultado importante na mesma região, foi o diagnóstico de infecção natural por *L.(V.) braziliensis* em *Lu. fischeri*. Esta espécie vem sendo incriminada como vetora da LTA na região sudeste do Brasil (Forattini 1972). A espécie é considerada altamente antropofílica (Forattini 1972), podendo estar participando da veiculação do parasito e conseqüentemente da transmissão de LTA em Porto Alegre. Nossos dados de

estimativa de infecção natural *Lu. fischeri* coletados em Porto Alegre, confirmam as suspeitas de vários autores e contribuem para a melhor compreensão de fatores envolvidos na dinâmica de transmissão da leishmaniose tegumentar na região, trazendo novas informações que ampliam o conhecimento sobre as espécies de *Lutzomyia* que ocorrem nessa área, potenciais espécies vetoras e a correta identificação dos parasitos circulantes. Por muito tempo, *Lu. neivai* foi considerada sinonímia de *Lu. intermedia*, sendo que Marcondes (1996), analisou o status taxonômico de *Lu. neivai*, considerando-a como espécie válida. Posteriormente, Andrade-Filho (2004), realizando um estudo morfológico detalhado confirmou *Lu. neivai* como uma espécie válida. Desta forma, as duas espécies (*Lu. intermedia* e *Lu. neivai*) são consideradas potencialmente como vetoras de *L. braziliensis*. É importante ressaltar, que as duas espécies podem ser encontradas em simpatria (Marcondes et al 1996; Andrade-Filho et al 2004, Galati 2003). O encontro de *Lu. neivai* naturalmente infectado com *Leishmania (Viannia)*, tanto no Rio Grande do Sul, observado neste trabalho, quanto em Santa Catarina (Marcondes et al, 2009) reforça o papel deste vetor na transmissão da *L. (Viannia)* . Entretanto acreditamos que a única espécie circulante neste vetor é *Leishmania (Viannia) braziliensis* em função da distribuição das outras espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

No Rio de Janeiro foi realizado um estudo recente que abordou várias as áreas endêmicas de leishmanioses do município, sendo *Lu. intermedia* a espécie predominante em um quadro composto de 18 espécies de flebotomos, seguido de *Lu. migonei* e *Lu. longipalpis* (Souza et al., 2003). Fato similar foi descrito em nosso trabalho, apesar do fator limitante de apenas cinco áreas investigadas, onde não foi possível a captura de exemplares de *Lu. longipalpis* (Tabela 4). De certa forma, estes dados mostram a tendência das duas espécies (*Lu. intermedia*, *Lu. migonei*) em compor um perfil de predominância nas localidades do município do Rio de Janeiro. Além disso, estes achados em conjunto corroboram a alta prevalência de *Lu. intermedia* em ambientes alterados (Carvalho et al., 1995; Lima et al., 1981; Rangel et al., 1984; Souza et al., 1995).

Constatamos uma tendência para a presença de flebotomos infectados nas localidades de Colônia Juliano Moreira e Pau da Fome, situadas no bairro de Jacarepaguá, com notificações de casos recentes de leishmaniose em cães e no homem. Estes dados reforçam a hipótese que a captura dirigida às áreas que apresentam um aumento de casos da doença,

favorece o encontro de fêmeas positivas, influenciando, desta forma, na estimativa do índice de infecção de flebotomos circulantes nessas localidades. No município do Rio de Janeiro, no ano de 2002, cinco casos humanos autóctones de LTA foram registrados em Colônia Juliano Moreira; em 2003 foram registrados mais sete novos casos (Souza MB, comunicação pessoal). Nossos resultados determinaram que 2% da fauna de flebotomos estavam infectados com *L. (V.) braziliensis* e os grupos positivos corresponderam às localidades de Colônia Juliano Moreira e Pau da Fome (Tabela 6) (Pita-Pereira et al., 2005). Este índice mostrou ser cerca de 11 vezes maior do que a taxa de infecção previamente sugerida usando o método de dissecação para o diagnóstico de flebotomos coletados no maciço da Pedra Branca, na região de Vargem Grande (Rangel et al., 1984).

Um fato curioso descrito neste trabalho foi relacionado à detecção de DNA de *L. (V) braziliensis* em *Lu. migonei*, nessas duas áreas; o que até então não havia sido descrito para as localidades do Rio de Janeiro. As primeiras evidências sobre infecção natural de *Lu. migonei* foram descritas em São Paulo (Pessoa & Pestana, 1940; Pessoa & Coutinho, 1941), onde foram identificadas formas leptomonas, possivelmente *Leishmania*, no tubo digestivo dos flebotomos. Trabalhos posteriores descreveram a presença de *L. (V) braziliensis* em espécimes de *Lu. migonei* provenientes da localidade de Baturité, no Ceará (Azevedo et al. 1990, Queiroz et al. 1991, 1994).

A LTA associada à *L. (V.) braziliensis* é de ocorrência notória no Estado do Rio de Janeiro (Marzochi, 1992; Grimaldi Jr & Tesh, 1993; Marzochi & Marzochi, 1994), sendo apontada *Lu. intermedia* como a espécie de maior potencialidade vetorial (Rangel et al 1995; Souza et al. 1995, Carvalho et al. 1995). Entretanto, ainda são escassas as notificações de infecção natural de *Lu. intermedia* por *L. (V.) braziliensis*, ensejando novos estudos que possam fornecer maiores subsídios para a compreensão da cadeia epidemiológica da LTA no Estado. Na verdade para que uma espécie de flebotomo seja incriminada como vetor deve-se identificar o parasito no vetor em conjunto com o índice de infecção na população humana/animal, causado pela mesma espécie de parasito. De certa forma, ambos os critérios foram confirmados em nosso estudo no Rio de Janeiro, uma vez que os grupos de amostras positivas foram detectados nas localidades com casos humanos/caninos recentes. Isto nos permite sugerir *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* como vetores possivelmente envolvidos na cadeia de transmissão da LTA por *L. (V) braziliensis* nas localidades estudadas. Apesar dos

poucos exemplares de fêmeas de *Lu. migonei* capturados, não houve diferença estatisticamente relevante entre as duas espécies, quanto ao índice de infecção, sugerindo que ambas possuem o mesmo potencial na veiculação da doença nas localidades de Pau da Fome e Colônia Juliano Moreira. A hipótese de *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* estarem compartilhando da veiculação de *L. (V.) braziliensis* foi sugerida em um estudo anterior realizado na área de Ilha Grande (Araújo Filho, 1979) e também no município do Rio de Janeiro (Rangel 1986)

Em relação à LVA, é importante ressaltar que no município do Rio de Janeiro, até o ano de 2006, 87 casos autóctones de leishmaniose visceral foram diagnosticados, porém na nossa pesquisa, não detectamos DNA de *L. chagasi* nas espécies de flebótomíneos coletados no período de 2003. Vale destacar, que durante nosso estudo não foi capturado nenhum exemplar de *Lu. longipalpis* nas áreas trabalhadas no Rio de Janeiro. e nenhum caso da doença foi notificado nos anos seguintes (revisto por Marzochi et al., 2009). Em outras regiões de LVA, onde não foi detectada a presença de *Lu. longipalpis* outras espécies de flebotmíneos vem sendo incriminadas (Salomon et al, 2009), como observado na região de São Vicente Ferrer, PE, onde encontramos infecção natural em *Lu migonei* por *Leishmania infantum chagasi* (Carvalho et al, 2010). Estes novos encontros mostram a possibilidade de outros vetores estarem envolvidos no ciclo da LVA. De acordo com as normas do Ministério da Saúde, o município do Rio de Janeiro está classificado como área de transmissão esporádica de LVA (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005). Isso poderia justificar não termos encontrado infecção natural nos flebotomíneos capturados no Rio de Janeiro.

Quanto à LTA na região sudeste do Brasil, até o momento, as incriminações sobre a tendência da participação de *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* no ciclo de transmissão foram feitas principalmente com base nos estudos de frequência e elevada antropofilia destes dípteros (Marzochi 1992, Lainson et al. 1994, Rangel et al. 1986; Falqueto 1995, Marzochi & Marzochi 1997), sendo poucos os registros sobre detecção do parasito em *Lutzomyia* (Forattini et al. 1972, Rangel et al. 1984).

O uso da *PCR* associada à hibridização vem permitindo a detecção de índices maiores de infecção em áreas endêmicas com casos recentes da doença. Como exemplo, temos os estudos envolvendo capturas dirigidas em Urana e Puerto Cabello na Venezuela, com estimativas de 1.1% da taxa de infecção natural (Feliciangeli et al.,1994), em Chaute no Peru,

também de 1.1% (Perez et al., 1994) e no Estado da Bahia, com índices de 1.5% (Miranda et al., 2002). Além disso, o diagnóstico de infecção natural pode nos fornecer indícios de possíveis surtos da doença nas áreas que estão sendo investigadas. Neste contexto, resolvemos investir em uma metodologia que pode ser ainda mais sensível, além de fornecer uma estimativa da carga parasitaria de flebótomos. O desenvolvimento de um ensaio de detecção e quantificação por PCR em tempo real, representa uma importante ferramenta para fornecer informações que auxiliam na compreensão da eco-epidemiologia das leishmanioses nas áreas de ocorrência da doença.

A padronização de qualquer ensaio diagnóstico, tem como base a determinação da sensibilidade e especificidade do teste, evitando assim a geração de resultados falso-negativos, que podem ocorrer pela presença de agentes inibidores nas amostras a serem testadas ou pela baixa sensibilidade de detecção do agente etiológico, como também a ocorrência de falso-positivos devido a contaminações ou falta de especificidade do ensaio.

Para a detecção do DNA de *Leishmania* com finalidade diagnóstica, distintos alvos têm sido utilizados para amplificação por PCR, tais como, DNA do cinetoplasto ou kDNA (genoma mitocondrial) e seqüências repetidas nucleares, por exemplo, DNA ribossomal, genes de mini-exon, alfa-tubulina, gp63, microsátélites e seqüências subteloméricas (Lopez et al., 1993; de Bruijin et al., 1992; Rodgers et al., 1990; Uliana et al., 1991, 1994; Van Eys et al., 1992; Guevara et al., 1992; de Oliveira et al., 2003; Floeter-Winter & Shaw 2004). Tem sido demonstrado que os distintos protocolos apresentam uma alta sensibilidade, embora a especificidade do método possa variar em função da seqüência alvo de escolha (Avilis et al., 1999; Weigle et al., 2002). Diversos autores têm relatado a maior sensibilidade do alvo de kDNA quando comparado com outros que também estão representados em múltiplas cópias no genoma (Mary et al., 2004, Lambson et al., 2000, Nicolas et al., 2002, Noyes et al., 1998).

Para o desenvolvimento dos ensaios quantitativos por PCR em tempo real, nosso primeiro desafio foi a seleção do alvo, e optamos pelos minicírculos do kDNA, pois além de estarem presentes em um grande número de cópias no genoma mitocondrial de *Leishmania* spp (cerca de 10.000 cópias), estas moléculas já vinham sendo empregadas como alvo de detecção para fins diagnósticos pela PCR multiplex por nós desenvolvida (Pita-Pereira et al., 2005). Vale ressaltar neste caso, que para se chegar no nível de espécie (ou subgênero) foi

necessário introduzir nos ensaios de PCR multiplex, uma etapa posterior de hibridização com sonda biotinizada específica desenhada para uma sequência interna do produto amplificado, correspondente à região conservada dos minicírculos do kDNA (Figura 4).

Mary et al (2004) otimizaram um ensaio de PCR em tempo real baseado no kDNA para estimar carga parasitária de *L. infantum* em amostras de pacientes do Mediterrâneo que apresentavam leishmaniose visceral. Os autores observaram uma estabilidade no número de cópias de minicírculos entre isolados de *L. infantum* provenientes de diferentes pacientes. Em nosso estudo, com a finalidade de gerarmos resultados confiáveis de quantificação com o alvo de kDNA, o primeiro passo foi relacionar os valores de Ct correspondentes às diluições seriadas de promastigotas de cultura de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, com aqueles gerados a partir de parasitos clonados, onde nesse caso, tínhamos a certeza da quantidade exata de parasitos por amostra. Em ambos os procedimentos, os valores de Cts correspondentes não apresentaram variações estatisticamente significativas (Tabela 8) Esses resultados validaram a utilização do kDNA como alvo, nos ensaios de quantificação das amostras de flebótomos do campo que foram positivas pelos ensaios prévios de PCR multiplex e hibridização.

Alguns trabalhos da literatura utilizam gene de cópia única, como G6PD (glicose-6 fosfato desidrogenase) e DNA polimerase (Castilho et al., 2008, Bretagne et al., 2001). Castilho et al (2008) desenvolveram uma metodologia de PCR em tempo real comparando os dois sistemas de detecção - SYBR green e TaqMan, desenhados para o alvo da G6PD. Ambos os procedimentos permitiram distinguir as espécies do subgenero *Viannia* em biópsias de pacientes e apresentaram uma boa sensibilidade, possibilitando a detecção de um único parasito presente nas amostras. O estudo de Bretagne et al (2001) utilizou como alvo o gene da DNA polimerase, para inferir carga parasitária em camundongos infectados experimentalmente com *L. infantum*. Através do sistema de sonda TaqMan foi possível a detecção entre 1 e 1,968 cópias do gene alvo, correspondente a pelo menos 1 parasito. Porém, Ranasinghe et al (2008), utilizando o mesmo protocolo de sonda TaqMan para o gene da DNA polimerase, em ensaios de quantificação experimental de *L. infantum chagasi* no seu vetor *Lu. longipalpis*, obtiveram uma sensibilidade inferior (120 parasitos) àquela demonstrada por Bretagne et al (2001). Quando comparamos a sensibilidade obtida por Ranasinghe et al (2008) com os resultados obtidos no presente estudo, podemos observar que o emprego do

kDNA para detecção e quantificação de *Leishmania* spp em flebótomos provenientes do campo se mostrou bem mais eficiente, com limite de detecção equivalente à 10^{-2} parasito.

Outros grupos relatam o emprego de sequência nucleares repetidas, como alvo molecular para quantificação de DNA de *Leishmania*. Schulz et al (2003), desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real com sonda fluorogênica desenhada para o gene de rDNA 18S, visando a confirmação de leishmaniose visceral em amostras clínicas humanas. A quantificação de parasitos foi realizada diretamente nas amostras clínicas (sangue, medula, pele e biópsias de fígado), atingindo uma concentração mínima de detecção de 94,1 parasitos/mL.

Gómez-Saladín et al (2005), descreveram pela primeira vez o emprego da metodologia de PCR em tempo real com sistema de sondas Taqman para o diagnóstico de infecção natural em flebotomíneos, utilizando *primers* gênero específicos para amplificação do gene da subunidade menor do rDNA de *Leishmania*. Os autores revelaram uma positividade de 2.9% em flebótomos coletados em duas províncias da Sicília, Itália. Nesse trabalho a PCR em tempo real foi utilizada apenas como uma ferramenta qualitativa.

Tupperwar et al (2008) utilizaram como alvo para quantificação o gene GP63, que é altamente conservado no gênero *Leishmania* e possui entre 7 e 70 cópias no genoma nuclear das diferentes espécies. A sensibilidade obtida de 10^{-1} parasito foi semelhante à que obtivemos com nossos ensaios baseados no alvo de kDNA (10^{-2}).

Dependendo da complexidade do material biológico que é utilizado, devemos avaliar se trabalhamos com um alvo extremamente específico, porém que diminui muito a sensibilidade do ensaio, ou com um alvo que nos permita aumentar muito essa sensibilidade e posteriormente também nos permite especificar nosso ensaio. Em nosso trabalho nós optamos por utilizar um alvo que aumenta a sensibilidade, mas também nos permite averiguar a especificidade. O número de cópias de nosso alvo é um fator essencial para determinar a sensibilidade (Bastien et al, 2008).

No nosso trabalho, a PCR em tempo real utilizando o sistema Power SYBR green mostrou ser mais sensível que a técnica de PCR multiplex (10^{-2} e 10^0 parasito, respectivamente), além de possibilitar a diferenciação entre os dois subgêneros de *Leishmania*, através da análise da curva de dissociação dos produtos amplificados a partir do alvo de kDNA. Grande parte da literatura sobre PCR em tempo real como ferramenta

diagnóstica em *Leishmania* descreve o emprego da tecnologia de sondas Taqman que é considerada um ensaio mais específico do que o uso do corante SYBR green, por se tratar de um ensaio em *nested*, ou seja, é utilizado um par de *primers* externo associado à um outro oligonucleotídeo desenhado especificamente para uma região interna do amplicon desejado. Contudo, o sistema SYBR green, além de apresentar um menor custo comparado com o TaqMan, permite verificar a especificidade do ensaio pela análise dos valores de Tm (*melting points*) dos produtos amplificados, fornecendo assim uma alta confiabilidade dos resultados.

Nosso segundo desafio durante a padronização do ensaio foi selecionar o tipo de amostras e o método de extração de DNA para a obtenção dos padrões de quantificação (calibração). Nas análises de quantificação absoluta, a seleção de amostras para a obtenção da curva de calibração (amostras padrão) é considerada um fator crítico para a interpretação dos dados. O fato de trabalharmos com amostras biológicas complexas, ou seja, visando a detecção de DNA de *Leishmania* no interior do trato digestório de flebotomíneos, buscamos realizar os ensaios de padronização tanto para promastigotas de *L. (V.) braziliensis* quanto para *Leishmania infantum chagasi*, utilizando amostras reconstituídas (lisados de flebotomíneos). Da mesma forma, testamos também misturar o DNA extraído das diluições de ambas as cepas de *Leishmania*, separadamente, com o DNA purificado a partir dos lisados de flebotomos. Os resultados obtidos com amostras reconstituídas (*grupo* de 10 insetos machos na presença de diluições seriadas de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*) foram semelhantes ao da mistura de DNA de flebotomo e DNA obtido das diluições de parasitos. Isso nos fez optar pelo uso de amostras reconstituídas como amostras padrão nos ensaios de quantificação, pois estas se aproximavam mais da realidade das nossas análises. Além disso, estas amostras apresentaram uma excelente eficiência na curva padrão construída a partir dos seus respectivos Cts e reprodutibilidade na quantificação de DNA de *Leishmania* (precisão inter-ensaios).

É reconhecido que métodos de extração de DNA diferem significativamente na pureza e no rendimento final, podendo afetar enormemente a qualidade dos resultados das determinações qualitativas e quantitativas. Sendo assim, para definirmos o protocolo de extração a ser empregado nas amostras de campo, comparamos dois métodos para avaliação da eficiência (determinada pela quantidade e qualidade do DNA) e reprodutibilidade: fenol-clorofórmio e kit comercial que emprega colunas de sílica. Usamos como parâmetro de

comparação, os Cts referentes à amplificação do gene *cacophony* (gene constitutivo de flebótomos), sendo que esses valores não deveriam variar, pois poderiam interferir na confiabilidade dos resultados de quantificação. Concluímos que, apesar dos dois métodos de extração de DNA fornecerem um rendimento médio semelhante, foi observado diferença significativa quanto à reprodutibilidade dos valores de Cts quando comparamos as amostras extraídas por fenol e pelo kit comercial, sendo este último o que conferiu uma maior homogeneidade na recuperação de DNA [$p < 0,05$] (Quadro 1). Esse passo foi importante, pois nos ensaios de validação da metodologia de PCR em tempo real com amostras de flebótomos provenientes das distintas regiões estudadas, selecionamos apenas as amostras, extraídas pelo kit comercial, que tiveram o valor das médias dos Cts do controle exógeno (flebótomo), dentro do intervalo de confiabilidade (Tabelas 10,11,12).

O primeiro trabalho envolvendo quantificação de carga parasitária em flebotomíneos foi descrito por Ranasinghe et al (2008), utilizando o sistema TaqMan previamente desenvolvido para o gene de cópia única da DNA polimerase alfa de *L. infantum* e um gene constitutivo de *Lu. longipalpis* (*periodicity*). Porém, neste estudo a metodologia foi aplicada para avaliação de infecção experimental de fêmeas de *Lu. longipalpis* com amastigotas de *L. infantum*. Não foi feita a validação com amostras de flebótomos de campo. O limite de detecção alcançado foi equivalente à 120 parasitos, definido como a menor concentração de DNA que gerou sinal de fluorescência em três replicatas.

Todo sistema de PCR em tempo real que emprega o corante SYBR green, faz-se necessário após a corrida averiguar a especificidade do ensaio, através da curva de dissociação térmica dos produtos amplificados, considerando que este corante tem a propriedade de se intercalar inespecificamente em qualquer fragmento de DNA dupla fita gerado. O decaimento do sinal de fluorescência dos *amplicons* pode ser observado quando o aumento de temperatura atinge aquela que induz a dissociação do DNA, ou seja o seu *melting point* ou Tm. O pico de dissociação gerado é característico de cada *amplicon*, principalmente em função do tamanho e da sequência de DNA, e da razão GC/AT. No nosso estudo, tivemos um resultado inesperado quando da utilização dos iniciadores para a região conservada dos minicírculos do kDNA, onde esperávamos obter um perfil único na curva de dissociação quando analisamos os produtos amplificados correspondentes às amostras padrão para *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania infantum chagasi*. Vale ressaltar que durante a padronização do

ensaio de PCR convencional multiplex, os mesmos iniciadores geraram um fragmento de mesmo tamanho (cerca de 120 pb) em todos os isolados de *Leishmania* spp testados (Pita-Pereira, 2004 – Tese de mestrado). Os resultados da análise da curva de dissociação revelaram a presença de dois picos distintos com leve sobreposição, correspondentes à valores de $T_m = 79,3^\circ$ para *L. (V.) braziliensis* e $T_m = 80,6^\circ\text{C}$ para *Leishmania infantum chagasi* (Figura 6).

Utilizando estratégia semelhante para os minicírculos do kDNA, Nicolas et al (2002) diferenciaram quatro das principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Eles compararam as temperaturas de dissociação dos produtos amplificados da região conservada, assim como da região variável destas moléculas nas espécies *L. donovani*, *L. tropica*, *L. infantum* e *L. major*. Dois valores de T_m foram obtidos para os amplicons derivados da região conservada, distinguindo *L. major* das outras três espécies. Como esperado, os resultados obtidos com os produtos da região variável forneceram uma análise mais refinada, possibilitando a distinção entre *L. major* e as demais espécies, como também *L. donovani* apresentou um T_m diferente de *L. infantum* e *L. tropica*. Os autores concluíram que a análise das curvas de dissociação térmicas oferece uma alternativa rápida para a identificação de espécies em estudos diagnósticos e epidemiológicos das leishmanioses.

Schulz et al (2003) também distinguiram entre os complexos *braziliensis*, *donovani* e os demais isolados de *Leishmania*, através dos *melting points* gerados pelos produtos amplificados contendo sequências do gene de rDNA 18S. Os dados foram corroborados através do sequenciamento destes produtos e comparação com sequências existentes no GenBank.

Tupperwar et al (2008), utilizando como alvo a GP63 em ensaios de PCR em tempo real, distinguiram a partir da curva de dissociação, *L. braziliensis* de *L. major*, *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. mexicana*, espécies que causam diversos espectros da doença. O T_m observado para os amplicons derivados de *L. braziliensis* variou cerca de 14% quando comparado aos valores de T_m das outras espécies.

No nosso estudo, a fim de avaliarmos o potencial da metodologia em diferenciar os parasitos ao nível de espécie, baseando-se nas curvas de *melting* dos produtos contendo a região conservada dos minicírculos de kDNA, introduzimos ao ensaio, mais duas espécies de cada subgênero: *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi*. Foi observado uma estreita correlação

entre os valores de Tm para as espécies pertencentes ao mesmo subgênero, isto é *L. (L.) amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi* com valores de Tm próximos a 80,6°C, e *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis* com Tm de 79,3°C (Figura7), o que demonstrou a capacidade limitada da região conservada dos minicírculos para a função de marcador molecular na diferenciação de espécies de *Leishmania*. Os resultados foram certificados ampliando a nossa amostragem com isolados previamente caracterizados de pacientes que apresentavam a forma tegumentar e visceral da doença

Alguns autores, utilizando a metodologia de PCR em tempo real com sistema TaqMan, descreveram a possibilidade de distinção entre diferentes complexos e até mesmo entre espécies de um mesmo subgênero. Wortmann et al (2005), utilizando como alvo o gene da glicosefosfato isomerase (GPI), o qual apresenta variabilidade em sua sequência de DNA para a identificação em nível de grupos de *Leishmania*, foram capazes de detectar e distinguir entre quatro complexos (*L. Viannia*, *L. mexicana*, *L. donovani/ infantum* e *L. major*), a partir de biópsias de tecido de pacientes que foram positivas no cultivo e cujos isolados foram previamente identificados por isoenzimas. O mesmo grupo já tinha demonstrado a capacidade do uso de sondas fluorogênicas em outro ensaio de PCR em tempo real para diagnosticar leishmaniose cutânea e visceral em nível de gênero, e também aplicaram o ensaio para a determinação da presença ou ausência da infecção em humanos e flebótomos vetores (Wortmann et al., 2001).

Castilho et al (2008), compararam os dois sistemas SYBR green e TaqMan -baseados no locus da glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PD) de *Leishmania*, para detecção e quantificação dos parasitos. O primeiro sistema possibilitou a identificação dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea nas Américas, pertencentes a ambos os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Já as sondas TaqMan foram capazes de distinguir entre *L. (V.) braziliensis* ou *L. (V.) peruviana* das outras espécies de *Viannia*, além de possibilitar a quantificação desses parasitos diretamente a partir de amostras de biópsias humanas.

É reconhecido que os ensaios de medida de quantificação baseados na hibridização de uma sonda interna (TaqMan) ao DNA que está sendo amplificado fornecem uma maior especificidade. No nosso trabalho, fez-se necessário a posterior clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados das quatro espécies de *Leishmania* que foram averiguadas quanto aos perfis da curva de dissociação geradas com o sistema SYBR Green. Esta análise teve

como objetivo identificar eventuais diferenças na seqüência conservada dos minicírculos que estariam acarretando os diferentes valores de T_m entre os dois subgêneros. O alinhamento das 12 sequências (representando três clones para cada uma das quatro espécies) demonstrou uma variação considerável (substituições de nucleotídeos, inserções e/ou deleções), possibilitando a construção de uma árvore a partir das sequências das regiões conservadas dos minicírculos de kDNA. A partir desta análise foi observada a formação de um grupo bem distinto com valor de bootstrap de 100%, que foi gerado pelas sequências de *L. shawi* e *L. braziliensis*, espécies do subgênero *Viannia*. Isso ocorreu devido a presença de sítios polimórficos compartilhados com predominância de adenina (A) e timina (T), o que justifica a mesma temperatura de dissociação observada a partir dos produtos amplificados na PCR em tempo real destas duas espécies (T_m 79.3°C). Em relação as cepas do subgênero *Leishmania*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, ambas formaram grupos com valores significativos de bootstrap (100% e 62%, respectivamente) dentro da mesma espécie, porém não formaram um segundo agrupamento, como observado para as espécies do subgênero *Viannia* (Figura 9). O fato de termos observado uma temperatura de dissociação mais elevada para os produtos amplificados do subgênero *Leishmania* (80.6°C) pode ser justificado, pela predominância das bases guanina (G) e citosina (C) nos sítios avaliados (Figura 8). A diferença na composição de bases entre as espécies analisadas de cada subgênero, parece corroborar os dois valores de T_m nas curvas de dissociação dos produtos amplificados pelo sistema Power SYBR green, tornando possível a distinção de espécies de subgêneros diferentes através da metodologia empregada.

Mais recentemente, Talmi-Frank et al. (2010) relatam o poder discriminatório de uma nova ferramenta de alta resolução para a análise da dissociação (*High resolution melt analysis* - HRM) de produtos de PCR derivados do espaçador interno transcrito do RNA ribossomal (gene ITS1). A técnica com potencial de distinguir entre sequências de DNA que diferem em apenas um único nucleotídeo, foi empregada para a identificação e quantificação de *Leishmania* do Velho Mundo diretamente de amostras de pacientes, hospedeiros reservatórios e flebotomíneos. Padrões distintos de *melting* foram exibidos para *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. infantum*, e assim como no nosso estudo, estas características foram verificadas por sequenciamento de DNA. As diferenças de nucleotídeos observadas entre as quatro espécies foram consistentes com os resultados de genotipagem obtidos pelos ensaios

de *melting* de alta resolução, exceto para *L. infantum* que apresentou um perfil semelhante ao de *L. donovani*.

A quantificação de *Leishmania* em flebotomíneos é importante para a avaliação da eficiência do desenvolvimento do parasito nas distintas espécies vetoras que estão envolvidas na transmissão de uma mesma espécie de *Leishmania*. Neste contexto, as diferenças relacionadas com a adaptação e colonização de uma determinada espécie no trato digestório do inseto podem justificar as diferenças quanto à capacidade vetorial do mesmo, as quais por sua vez poderão contribuir para a definição do grau de endemicidade de áreas com notificações de casos de leishmanioses (Montoya-Lerma et al., 2003). Também é reconhecido que a “dose” de infecção varia quando se trata de infecção natural, comparada aos ensaios de experimentação, onde no primeiro caso, isto é, em condições naturais, a inoculação provavelmente consiste de 1 a 1000 metacíclicos, enquanto em situações artificiais pode atingir alguns milhares (Rogers et al., 2004; Warburg & Schlein 1986).

Padronizamos um ensaio diagnóstico, que nos possibilitou quantificar e distinguir o subgênero dos parasitos presentes no trato digestório dos flebotomíneos. Para validar este ensaio padronizado, optamos por utilizar os flebotómos coletados em áreas que obtivemos resultados positivos para infecção natural. As áreas de Além Paraíba, Saquarema e Rio Bonito não foram estudadas, pois além de nestas áreas não termos obtidos resultados positivos pelo diagnóstico qualitativo, o número de espécimes coletados era muito grande e optamos por estudar apenas as áreas onde tínhamos certeza da quantificação, pois nestas regiões obtivemos grupos de flebotomíneos que foram diagnosticados positivos para infecção natural.

A quantificação da dose infecciosa de parasitos transmitidos pela picada dos flebotomíneos, foi recentemente estudada por Kimblin et al (2008), onde os autores utilizaram como modelo a transmissão de *Leishmania major* por *Phlebotomus duboscqi* em orelhas de camundongos. Os resultados obtidos foram variados, porém a maioria das doses infecciosas ficou abaixo de 600 parasitos e a proporção de 1 a cada quatro animais infectados apresentou uma dose superior a 5 000 parasitos. Para estudar o desenvolvimento da doença foram avaliados os camundongos infectados com 100 e 5000 parasitos. Os camundongos infectados com altas doses desenvolveram rapidamente as lesões enquanto aqueles

infectados com doses menores, desenvolveram a doença mais lentamente ou não desenvolveram os sinais clínicos, mas apresentaram um alto nível de parasitos quando avaliados num período prolongado após a infecção, os colocando como importantes reservatórios ou fontes de infecção para a veiculação desses parasitos.

Nosso trabalho é o primeiro estudo onde a metodologia de quantificação de carga parasitária é validada em flebotómos coletados no campo. Ranasinghe et al (2008), padronizaram um ensaio com fêmeas infectadas em laboratório, porém não utilizaram a metodologia para quantificar carga parasitária em flebotómos do campo. Das três áreas estudadas Corumbá foi aquela considerada como de alta endemicidade para LVA, pois só diagnosticamos fêmeas positivas para infecção por *L. infantum chagasi* (*Lu. cruzi* e *Lu. foratirii*). Das amostras quantificadas verificamos que *Lu. cruzi* foi a espécie que apresentou maior carga parasitária quando comparada a *Lu. foratirii* ($p < 0,05$), demonstrando seu provável papel como principal espécie vetora na área estudada. Porém quando estudamos as amostras de *Lu. foratirii* obtivemos um maior número de grupos positivos pela PCR em tempo real (dois novos grupos foram detectados por esta técnica), porém a carga parasitária desta espécie quando comparada a primeira foi inferior ($p < 0,05$).

Porto Alegre (área de baixa endemicidade de LTA), seria uma área atípica, pois é uma região de casos recentes e a doença encontra-se em processo de introdução na região. Nesta área a quantificação de carga parasitária foi semelhante a Corumbá, tanto *Lu. neivai* que até o momento é a principal espécie incriminada como vetora de LTA em Porto Alegre, quanto *Lu. cruzi*, principal espécie vetora de LVA em Corumbá, apresentaram uma carga parasitária semelhante (Tabelas 10 e 11). Considerando que Porto Alegre é atualmente uma área de casos recentes da doença, pois até 2000 não haviam casos de Leishmaniose descritos, podemos sugerir a partir de nossos resultados, uma tendência a um aumento no número de casos neste município. Ainda é importante ressaltar as duas outras espécies detectadas com infecção natural nessas duas áreas: *Lu. foratirii* em Corumbá e *Lu. fischerii* em Porto Alegre, que poderiam estar assumindo um papel de vetoras secundárias ou pelo menos, de mantenedoras da parasitose nas regiões estudadas.

No Rio de Janeiro (Tabela 12), em relação a LTA, na localidade de Pau da Fome, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as medidas

de carga parasitária, sugerindo assim que ambas as espécies possam estar compartilhando da veiculação da LTA na área. O mesmo não foi observado em Colônia Juliano Moreira, onde *Lu. intermedia* apresentou uma carga parasitária superior a *Lu. migonei*.

Através do nosso estudo, comparando com os resultados obtidos por Kimblin et al (2008) podemos sugerir que nas áreas de alta endemicidade obtivemos uma maior carga parasitária, principalmente de uma espécie que seria a principal responsável pela veiculação da doença, porém tínhamos uma segunda espécie que provavelmente veicularia também a doença, mas além disso seria responsável pela manutenção do parasito naquele ambiente. A área de alta endemicidade foi a que apresentou maior carga parasitária por grupo, mas é importante ressaltar que Porto Alegre apresentou carga parasitária muito próxima a Corumbá, sendo uma área considerada de baixa endemicidade, até o momento. E que a área de média endemicidade (Rio de Janeiro) apresentou uma carga parasitária baixa e constante em todas as amostras positivas (Tabela 12), demonstrando uma manutenção no número de casos. Para termos um estudo mais detalhado em relação a importância da carga parasitária de determinada espécie de flebotômio, nas diferentes áreas endêmicas, um número maior de áreas, tanto de LVA quanto de LTA deve ser analisado, além de quantificarmos indivíduos e não grupos de insetos e assim avaliarmos se o perfil de quantificação nessas áreas de alta, média e baixa endemicidade se mantém. Dessa forma, poderemos avaliar se existe um padrão ou o perfil de quantificação particular a cada área estudada.

Em nosso trabalho fizemos uma avaliação em três áreas distintas, que nos forneceu informações que permitem ter uma visão inicial da quantidade de carga parasitária que estaria sendo veiculada nessas áreas. Desta forma pudemos desenvolver uma análise inicial se a carga parasitária está diretamente relacionada ao número de casos, ou seja, o maior número de casos está relacionado a uma maior carga parasitária por inseto, ou se estaria relacionado a um maior número de insetos infectados. Através de nossos resultados e os obtidos por Kimblin et al 2008 podemos supor que a carga parasitária está diretamente relacionado ao número de casos da doença e que espécies que assumiriam um papel secundário nessas áreas, seriam responsáveis, principalmente pela manutenção do parasito no ambiente.

A quantificação de carga parasitária em flebotômios nos permite ter uma visão do quadro da veiculação de *Leishmania* spp nas áreas estudadas. Considerando que cada área

possui particularidades relacionadas ao ambiente, espécies de vetores e parasitos, o nosso estudo poderá constituir uma importante ferramenta para monitorar o papel das espécies de flebotomos em áreas endêmicas de LTA e LVA, fornecendo dados que contribuem para a compreensão das diferenças epidemiológicas em cada foco da doença, além de auxiliar nas medidas de prevenção e controle das leishmanioses.

7. Conclusões:

A técnica de PCR multiplex seguida de hibridização com sonda biotilada e revelação por quimioluminescência nos permitiu avaliar o índice de infecção natural em flebotomíneos capturados em diferentes áreas do Brasil e também identificar a espécie de *Leishmania* veiculada por esses insetos, possibilitando a correlação entre a espécie de flebotomíneo e a espécie de *Leishmania* circulantes nas diferentes áreas endêmicas, fornecendo dados sobre novas possíveis espécies vetoras;

O ensaio de PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção por SYBR green padronizado, foi eficiente para quantificação de carga parasitária dos insetos coletados. A metodologia de detecção utilizada, nos possibilitou a discriminação das espécies de leishmanias presentes nos insetos positivos, a nível de subgênero, salientando que este sistema de detecção apresenta um menor custo em relação a outros métodos de detecção utilizados (sondas TaqMan). Sendo uma metodologia rápida, sensível e mais eficiente, principalmente quanto a sua manipulação, sem a necessidade de visualização em gel de agarose;

Através da metodologia de quantificação foi possível correlacionar a carga parasitária dos flebotomíneos infectados naturalmente com a endemicidade da Leishmaniose nas áreas estudadas, sendo que para um estudo mais refinado, se faz necessária a quantificação de carga parasitária por inseto individualmente e não por grupos de 10 espécimes;

O estudo desenvolvido utilizando a PCR multiplex seguida de hibridização não radioativa e a PCR em tempo real, forneceram importantes dados quanto a avaliação de índice de infecção

natural, identificação e quantificação de *Leishmania* spp. nos insetos flebotomíneos coletados nas diferentes áreas endêmicas estudadas, auxiliando na compreensão da eco epidemiologia das leishmanioses nestas localidades.

8. Referências bibliográficas

Adini, I, Jacobson RL, Kasap, M, Schlein Y, Jaffe C. 1998. Species-specific detection of *Leishmania* in sandflies using an enzymed-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 35-37.

Aguiar, GM; Vilela, ML & Lima, RB. 1987. Ecology of the Sandflies of Itaguaí, an Area of Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food Preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, 84: 583 - 584.

Alvar J, Molina R, San Andre´s M, Tesouro M, Nieto J, et al. (1994) Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 371–378.

Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL, 2004. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(8): 1059–1065.

Añez N, Nieves E, Cazorla D 1989 The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;83(5):634-5.

Antoine, JC, Prina, E, Jouanne, C. 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophage maintain an acidic pH. *Infect Immunol*, 58: 779-787.

Aragão, HB. 1922. Transmissão da Leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil Médico*, 36 : 129.

Aransay, AM, Scoulica E, Tselentis, Y. 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*, 66(5):1933-8.

Araújo Filho, NA, 1979. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudo Sobre a Infecção Humana, Reservatórios e Transmissores. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 148pp.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Pan American Health Organization, Brasilia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2(2):145-6.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, de Freitas RA, Biancardi CB, Castellon EG. 1985. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg.* Nov;34(6):1098-108.

Arias JR, Freitas RA. 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2: Incidência de flagelados em flebótomos selváticos. *Acta Amazônica;* 8:387-96.

Arruda, W., Costa, F.C., Nahas, S., Rosenfeld, G., 1949. Leishmaniose visceral americana. *Bras. Med.* 63, 64–65.

Ashford, RW. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol,* 14: 523-532.

Ashford RW, Thomson MC. 1991. Visceral leishmaniasis in Sudan. A delayed development disaster? *Ann Trop Med Parasitol;*85(5):571-2.

Azevedo, AC, Rangel, EF. 1991. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturite, Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 86(4):405-10.

Azevedo, AC, Rangel, EF, Queiroz, RG. 1990. *Lutzomyia migonei* (Franca 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturite, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 85(4):479.

Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi EMR, Mohebbi M. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100:63-8.

Barker, DC. 1989 Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology;* 99:125–146.

Barker, DC. 1987. DNA Diagnosis of Human Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 3: 177-184.

Barral, A, Pedral-Sampaio, D, Grimaldi Junior, G, Momen, H, McMahon-Pratt, D, Ribeiro de Jesus, A, Almeida, R, Badaro, R, Barral-Netto, M, Carvalho, EM. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, 44(5):536-46.

Barretto, AC, Cuba, CA, Marsden, PD, Vexanat, JA, De Belder, M. 1981. Epidemiological features of cutaneous leishmaniasis americana in an endemic region of the state of Bahia, Brazil. I. Human leishmaniasis. *Bol Oficina Sanit Panam*, 90(5):415-24.

Barretto, M P. 1943. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do Estado de São Paulo (Díptera, Psychodidae). São Paulo. (Tese de Livre-Docência da Faculdade de Medicina da USP).162 pp.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. 2008. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microb*, 46(6):1897–900.

Bates, PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.

Bates, P.A., Ashford, R.W., 2006. Old World leishmaniasis. In: Cox, F.E.G., Wakelin, D., Gillespie, S.H., Despommier, D.D. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, tenth ed. Parasitology, Hodder Arnold, London, pp. 283–312.

Beverley, SM, Akopyants, NS, Goyard, S, Matlib, RS, Gordon, JL, Brownstein, BH et al. 2002. Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 47-53.

Blackwell, J. M. & Melville, S. E. 1999. Status of protozoan genome analysis: trypanosomatids. *Parasitology* 118, S11–S114.

Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT (1986) Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis*

(Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 143–145.

Brandão-Filho, SP, Shaw, JJ. 1994. Leishmaniasis in Brazil. *Parasitol. Today*, 10: 329-330.

Brazil BG, Lino-Neto J, Brazil RP. 2003. Preparation of sand fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens for histological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98(2):287-90.

Brazil, RP, De Almeida, DC, Brazil, BG, Mamede, SM. 1991. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia*, 33 Suppl:113-7.

Brazil, RP, Morton, IE & Ward, RD. 1991. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (N) withmani* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 497-498.

Brazil, B.G., Teixeira, P.M.F., Minafra Jr., C.A., Temeljkovitch, M., Almeida, E.C., Brazil, R., 2002. Infecção natural de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Ascogregarina chagasi* (Adler & Mayrink, 1964). *Entomol. Vect.* 9, 289–293.

Brenière SF, Telleria J, Bosseno MF, Buitrago R, Bastrenta B, Cuny G, Banuls AL, Brewster S, Barker DC. 1999. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop.* 15;73(3):283-93

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(4):828-31.

Brewster S, Barker DC. 2002. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (Viannia) species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96 Suppl 1:S55-63.

Butcher, BA, Turco, SJ, Hilty, BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks, DL. 1996. Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem*, 23;271(34):20573-9.

Cabrera OL, Munsterman LE, Cardenas R, Gutierrez R, Ferro C. 2002 Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomedica (Bogota)*; 22:296-302.

Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho S. 2010 Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop*; doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.009

Carvalho,GML Andrade Filho JD, Falcao,AL,Rocha Lima, A C.V.M, Gontijo, CM. 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 3, 407-414.

Carvalho MR, Lima BS, Marinho-Júnior JF, da Silva FJ, Valença HF, Almeida Fde A, da Silva AL, Brandão-Filho SP 2007 Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. *Cad Saude Publica*;23(5):1227-32.

Carvalho, RW, Serra-Freire, NM, Souza, MB. 1995. Fauna de flebotomos da Ilha do Araújo, Município de Paraty-RJ. 1- Diversidades e aspectos do comportamento. *Parasitologia, Al Dia* 19: 104-112.

Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. 2008 A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg*. ;78(1):122-32.

Chevalier B, Carmoi T, Sagui E, Carrette P, Petit D, De Mauleon P, Pourriere M, Martinie C, Didier C. 2000. Report of the first cases of cutaneous leishmaniasis in East Timor. *Clin Infect Dis*.;30 (5):840.

Cazzulo, JJ. 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J*, 6(13):3153-61. Review.

Cerqueira, AC & Vasconcellos, A. 1922. A Leishmaniose nesta capital. Boletim Sanitário. *Publicações Científicas de Departamento Nacional de Saúde Pública*, 1: 35-47.

Córdoba-Lanús E, De Grosso ML, Piñero JE, Valladares B, Salomón OD, 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98(1): 1–5.

Cupolillo, E, Aguiar Alves, F, Brahim, LR, Naiff, MF, Pereira, LO, Oliveira-Neto, MP, Falqueto, A, Grimaldi, G, Jr, 2001. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol (Berl)*,190(1-2):57-60

Cupolillo, E, Medina-Acosta, E, Noyes, H, Momen, H, Grimaldi, Jr, G. 2000. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasit Today*, 16: 142-144

Cupolillo, E, Grimaldi, Jr, G, Momen, H. 1995. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 73: 145-155.

Dantas-Torres, F & Brandão-Filho, SP. 2006. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48(3):151-156.

de Gouvea-Vianna L, de Assis TS, Orsini M, da Silva AR, de Souza GF, et al. (2008) Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 548–555.

De Bruijn, MH, Barker, DC. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*, 52(1):45-58.

De la Cruz, VF, Neckelmann, N, Simpson, L. 1984. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *J Biol Chem*, 259(24):15136-47.

de Oliveira CI, Bafica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, Nascimento E, Costa JM, Barral A. 2003. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 37: e149–e153.

Deane, LM, Deane, MP. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil : geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop*, 4: 198-212.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U.1994 Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.;89(3):463-9.

Degrave, W, Fragoso, SP, Britto, C, van Heuverswyn, H, Kidane, GZ, Cardoso MA, Mueller, RU, Simpson, L, Morel, CM. 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1;27(1):63-70.

Desjeux P. 2004 Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*; 27: 305 - 318.

Desjeux, P. 1999. Global Control and *Leishmania* HIV Co-Infection. *Clin Dermat*, 17: 317-325.

Desjeux, P, Alvar, J & Gradoni, L. 1997. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases of *Leishmania*/HIV coinfection. Geneva: *World Health Organization* 1: 11- 13.

Dias-Sversutti A, Scodro RB, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U 2007. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the state of Paraná, South Brazil. *Neotrop Entomol* 36: 953-959.

Dinesh, DS, Kar, SK, Kishore, K, Palit, A, Verma, N, Gupta, AK, Chauhan, DS, Singh, D, Sharma,VD, Katoch, VM. 2000. Screening sandflies for natural infection with *Leishmania donovani*, using a non-radioactive probe based on the total DNA of the parasite. *Ann Trop Med Parasitol*, 94(5):447-51.

Englund PT. 1982. The molecular biology of Trypanosomes. *Ann. Ver. Biochem*, 51: 695-726.

Escobar, MA, Smith, DS, Palma, GI. 1992. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): A diagnostic challenge. *Tropica Doctor*, 22: 69-78.

Evans, TG, Teixeira, MJ, McAuliffe, IT, Vasconcelos, IAB, Vasconcelos, AW, Sousa AQ, Lima, JWO, Pearson, RD. 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Inf Dis* 166: 1124-1132.

Falqueto A 1995. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo, Tese de Doutorado, Fiocruz, Rio de Janeiro, 84 pp.

Feliciangeli, MD, Rodriguez, N, De Guglielmo, Z, Rodriguez, A. 1999. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite*, 6(2):113-20.

Feliciangeli, MD, Rodriguez, N, Bravo, A, Arias, F, Guzman, B. 1991. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol*, 8(4):317-24.

Feliciangeli MD. 1988. Ecology of sandflies (Diptera: *Psychodidae*) in a restricted focus of cutaneous leishmaniosis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82 (1): 119 - 124

Fernandes, O, Bozza, M, Pascale, JM, de Miranda, AB, Lopes, UG, Degraive, WM. 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (*Viannia*). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(3):279-84.

Fernandes, O, Murthy, VK, Kurath, U, Degraive, WM, Campbell, DA. 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, 66(2):261-71.

Ferreira, AL, Sessa, PA, Varejao, JB, Falqueto, A. 2001. Distribution of sand flies (Diptera: *Psychodidae*) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96:1061-1067.

Floeter-Winter LM, Shaw JJ. 2004. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res Adv in Microbiology* 4: 63–79.

Forattini OP, Rabello EX, Serra OP, Cotrim MD, Galati EAB, Barata JMS 1976. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 10: 31-43.

Forattini, O. 1973. *Entomologia Médica* São Paulo: Edgard Blucher, Universidade de São Paulo, v. 4.

Forattini, OP, Rabello, EX, Pattoli, DBG, Ferreira, OA. 1972. Nota Sobre um Foco de Leishmaniose Tegumentar na Região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* de São Paulo, 6: 103 – 105.

Forattini, O. 1953. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares, no estado de São Paulo. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 7: 157-168.

Fraiha, H & Ward. 1974. A new species of *Psychodopygus* Mangabeira (Díptera: Psychodidae) from the Transamazônica highway, Pará State, Brazil. *Bulletin Entomological Research*, 64: 209-212.

Fraiha, H, Shaw, JJ, Lainson, R. 1971. Phlebotominae Brasileiros II. *Psychodopygus wellcomei*, nova espécie antropófila de flebotomo do grupo *squamiventris*, do sul do estado do Pará, Brasil (Díptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 69: 489-500.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 30;137(3-4):214-21.

Freitas, R.A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., 2002. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97,53–59.

Galati, E.A.B., Rego Jr., F.A., Nunes, V.L., Teruya, E., 1985. Fauna flebotomínica do Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyiaforattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rev. Brasil. Entomol. 29,261–266.

Fu G, Perona-Wright G, Barker DC. 1998. *Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. Experimental Parasitology 90: 236-243.

Galati EAB, Fonseca MB, Marassá AM, Bueno EFM. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(8): 1148-1158

Galati, EAB, Nunes, VL, Boggiani, PC, Dorval, ME, Cristaldo, G, Rocha, HC, Oshiro, ET, Damasceno-Júnior, GA. 2006 Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz;101:175–193.

Galati EAB 2003. Morfologia e taxonomia. In Flebotomíneos do Brasil, EF Rangel, R Lainson (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-176.

Galati EA, Nunes VL, Rego Júnior Fde A, Oshiro ET, Chang MR. 1997. *Phlebotomines* (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Saude Publica. 31(4):378-90. Português.

Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, da Rocha HC, Garcia WB.1996. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Saúde Pública; 30(2):115-28

Galati, E.A.B., Rego Jr., F.A., Nunes, V.L., Teruya, E., 1985. Fauna flebotomínica do Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyiaforattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rev. Brasil. Entomol. 29,261–266.

Garcia AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC.2007 Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular

characterization of a periodomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 101:1208-13

Garnham, PC. 1971. The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ*, 44(4):477-89.

Gomes A C, Rabello EX, Ferreira Santos JL, Galati EA, 1982. Ecological aspects of cutaneous leishmaniasis americana. 2. Artificial ecotopes shelter for *Psychodopygus intermedius* and observations on feeding and reproduction under the influence of natural physical factors. *Rev Saude Publica*. Jun;16(3):149-59.

Gomes, AC. 1979. Observações Ecológicas sobre *Psychodopygus intermedius* no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Tese de Doutorado, São Paulo. Universidade de São Paulo.

Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M. 2005. Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 72(2):138-41.

Gonçalves SBRD, 2003. Identificação da Fauna de Flebotomíneos em Função de Casos Autóctones de LTA. *Boletim Epidemiológico, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre* 21(5): 5–5 [in Portuguese].

Gonçalves MD, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ 1985 The retained capacity of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) to transmit *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas) after eight years (64 generations) in a closed laboratory colony. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.;80(3):337-8.

Gontijo B, de Carvalho Mde L. 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*.;36(1):71-80. Review.

Graham, S. V. 1995 Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol. Today* 11, 217–223.

Grimaldi, Jr., G, Tesh, RB. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, 6: 230-250.

.....

Grisard E, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, 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.

Guevara P, Alonso G, da Silveira JF, de Mello M, Scorza JV, Añez N, Ramírez JL. 1992. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol*. 56(1):15-26.

Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin Microbiol Rev*, 14: 229-243.

Handman, E. 2000. Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.*, 44: 1-39.

Hashiguchi, Y, Gomez, EO, De Coronel, VV, Mimori, T, Kawabata, M, Furuya, M, Nonaka, S, Takoaka, H, Alexander, JB, Quizhpe, AM, Grimaldi, Jr, G, Kreutzer, RD, Tesh, R. 1991. Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*-“like” parasites. *Am J Trop Med Hyg*, 44: 205-217.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N.1998 Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol*. 36(7):1989-95.

Herting, M. 1942. *Phlebotomus* and Carrion’s disease. *American Journal of Tropical Medicine*, 22: 1-81.

Herwaldt, B. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.

Higgins JA, Azard AF. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. *J Med Entomol* 1995; 32:213-22.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censos Demográficos, Brasil. Accessed in 4th May 2006. Available at: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309, 436–442.

Jorquera A; González R; Marchán-Marcano E; Oviedo M; Matos M. 2005 Multiplex-PCR for detection of *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100: 45 - 48.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*; 72(1):87-93.

Kato H, Gomez EA, Yamamoto Y, Calvopiña M, Guevara AG, Marco JD, Barroso PA, Iwata H, Hashiguchi Y. 2008 Natural infection of *Lutzomyia* *tortura* with *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* in an Amazonian area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*.;79(3):438-40.

Kawa, H, Sabroza, PC. 2002. Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro. *Cadernos de Saude Publica*, 18(3):853-65.

Killick-Kendrick, R. 1990. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*.; 65 Suppl 1:37-42. Review.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17:279–89

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4(1): 1 - 24.

Killick-Kendrick, R, Lainson, R, Rioux, J, Safjanova, W. 1986. *The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles*. Em: *Leishmania*. Em: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Editor: J Rioux. IMEEE, Montpellier, pp. 143-148.

Killick-Kendrick, R., Ward, R.D., 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology* 82,143–152.

.....

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D. 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22;105(29):10125-30.

Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004 Jun;5(2):150-63

Lainson, R, Rangel, EF. 2005 *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100:811–827.

Lainson, R, Shaw, JJ. 2005 New World Leishmaniasis. In: Cox, FEG, Wakelin, D, Gillespie, SH, Despommier, DD, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th ed. London: ASM Press;:313–349.

Lainson, R, Shaw, JJ. 1998. New World Leishmaniasis- The neotropical *Leishmania* species. *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson 9th Edition, chapter 13, p., 241- 266

Lainson, R, Shaw, JJ, Silveira, FT, Souza, AAA, Braga, RR, Eay, I. 1994. The dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Eco-epidemiology of the Disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89: 435-443.

Lainson, R, Shaw, JJ. 1992. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonia, Brazil. *J Braz Ass Adv Sci*, 94: 94-106.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O. 1990. Amazonian visceral leishmaniasis—distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 135–137.

Lainson, R, Shaw, JJ. 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*, 64(1):3-9.

Lainson, R, Shaw, JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W, Killick-Kendrick, R eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, 1-120.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RS, Silveira FT.1985. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79(2):223-6

Lainson, R. 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans Royal Soc Trop Med.Hyg*, 77: 569-596.

Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Fraiha H 1973. Leishmaniasis in Brazil. IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex. Importance of sand flies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *Leishmania braziliensis braziliensis* in North Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67: 184-196.

Lainson, R, Shaw, JJ. 1972. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *Brit Med Bull*, 28: 44-48.

Lambson B, Smyth A, Barker DC. 2000. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp Parasitol*. 94(1):15-22.

Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E. 2002. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. *An Bras Dermatol*; 77: 681 - 692.

Lima, LCR, Marzochi, MCA, Sabroza, PC. 1981. Flebotomíneos em Área de Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar no Bairro de Campo Grande, R.J, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 33: 64 - 74.

Lins, RM, Oliveira, SG, Souza, NA, de Queiroz, RG, Justiniano, SC, Ward, RD, Kyriacou, CP, Peixoto, AA. 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol. Biol*, 11 (2): 117- 22.

Lopez M, Inga R, Cueva N, Alvarez E, Arevalo J. 1993. PCR: a tool for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a health post of rural endemic areas. *Arch Inst Pasteur Tunis.* ;70(3-4):499-504

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.*49(3):348-56

Lutz, A, Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 4: 84-95.

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V. 2000 *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* ; 94(6):623-31.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. 2004. Identification of *Leishmania infantum chagasi* isolated from healthy skin symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8: 440-444.

Marcondes CB, Bittencourt IA, Stocoa PH, Egerb I, Grisard EC, Steindel M 2009. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 1093—1097

Marcondes CB, Day JC, Ready PD 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 CB, 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.

Martín-Sánchez J, Gallego M, Baron S, Castillejo S, Morillas-Marquez F. 2006. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 100(6):527–32.

Marzochi, MCA, Fagundes, A, Andrade, MV, de Souza, MB, Madeira, MF, Mouta-Confort, E, Schubach, AO, Marzochi, KB. 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(5): 570-580.

Marzochi, MCA, Marzochi, KB. 1994. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10: 359-375.

Marzochi, MCA 1992. Leishmanioses no Brasil. *J Bras Med*, 63: 82-104.

Mauel, J. 1996. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol*, 38:1-51. Review.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 123-137

Maurício, IL, Stothard, JR, Miles, MA. 2000. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasit Today* 16: 188-189.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H.2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*;42(11):5249-55.

Michalsky, EM, Fortes-Dias, CL, Pimenta, PF, Secundino, NF, Dias, ES. 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 44(5):255-9.

Ministério da Saúde do Brasil (2008) Casos confirmados de leishmaniose visceral, segundo UF de residência, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2006. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lv.pdf (Accessed 10 Dec 2008).

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2a edição, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Editora MS, Brasília, DF

Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana - Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada 2006. Brasil, 1980 – 2005. Disponível em <http://www.saude.gov.br>.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Editora MS, Brasília, DF.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2000. Manual de Controle da LTA. Ministério da Saúde, Brasília, DF

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 1999. Informe epidemiológico do SUS 7: 86-87.

Miranda, JC, Reis, E, Schriefer, A, Goncalves, M, Reis, MG, Carvalho, L, Fernandes, O, Barral-Netto, M, Barral, A. 2002. Frequency of Infection of *Lutzomyia Phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(2):185-8.

Minodier, P, Piarroux, R, Gambarelli, F, Joblet, C, 1997. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. *J Clin Microbiol*;35:2551–2555.

Molyneux, DH, Killick-Kendrick, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters W, Killick-Kendrick R. eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London. *Academic Press*, 121-176.

Momen, H, Grimaldi, Jr G, Pacheco, RS, Jaffe, CL, McMahon-pratt, D, Marzochi, MCA. 1985. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 34: 1076-1084.

Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. 2003 Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop*; 85:19-29

.....

Mukherjee, S, Hassan, MQ, Ghosh, A, Ghosh, KN, Bhattacharya, A, Adhya, S. 1997. Short report: *Leishmania* DNA in Phlebotomus and Sergentomyia species during a kala-azar epidemic. *Am J Trop Med Hyg*, 57(4):423-5.

Muller, N, Zimmermann, V, Forster, U, Bienz, M. 2003. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol*;114:223–229.

Myler, P. J. & Stuart, K. D. 2000 Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 412–416.

Nascimento, JC, Paiva, BR, Malafronte, RS, Fernandes, WD, Galati, EAB. 2007. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(2): 119-122

Nicolas L, Milon G, Prina E. 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods*.51(3):295-9.

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1666-9.

Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D, 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 36: 2877–2881.

Noyes, HA, Arana, BA, Chance, ML, Maingon, R. 1997. The *Leishmania* hertig (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J Eukaryot Microbiol*, 44 (5):511-7.



Oliveira AL, Paniago AM, Dorval ME, Oshiro ET, Leal CR, et al. (2006) [Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 446–450.

Oliveira, AG, Galati, EAB, Oliveira, O, Oliveira, GR, Espindola, ACE, Dorval, MEC, Brazil, RP. 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 101 (8): 869-874

Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP . 2003 Jul-Aug; Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000. *Cad Saude Publica* 19(4):933-44. Epub 2003 Sep 8.[Artigo em Português]

Oliveira AG, Falcão AL, Brazil RP . 2000. First record of finding *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in the urban area of Brazil]. *Rev Saude Publica*. 2000 Dec;34(6):654-5. Portuguese.

Paiva, BR, Secundino, NFC, Pimenta, PFP, Galati, EAB, 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Díptera, Psychodidae)pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saúde Pública*; 23:87–94.

Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafronte RS.2006 Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop*; 99:252–59

Pandey K, Pant S, Kanbara H, Shuaibu MN, Mallik AK, Pandey BD, Kaneko O, Yanagi T.2008. Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal. *Parasitol Res*; 103(2):293-7.

Passos, VM, Lasmar, EB, Gontijo, CM, Fernandes, O, Degrave, W, 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(1):19-20

.....

Passos, VM, Falcao, AL, Marzochi, MC, Gontijo, CM, Dias, ES, Barbosa-Santos, EG, Guerra, HL, Katz, N. 1993. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88(1):103-10.

Pearson, RD, Souza, AQ. 1996. Clinical Spectrum of *Leishmania*. *Clin Infec Dis*, 22: 1-13.

Perez JE, Veland N, Espinosa D, Torres K, Oigusuku E, Llanos-Cuentas A, Gamboa D, Arévalo J. 2007. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(5):655-8.

Perez, JE, Oigusuku, E, Inga, R, Lopez, M, Monje, J, Paz, L, Nieto, E, Arevalo, J, Guerra, H. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(2):161-4.

Pessoa, SB, Coutinho, JO. 1941. Infecção Natural do *Phlebotomus pessoai* por Formas em Leptomonas, Provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene*, 10(2): 139 - 142.

Pessoa, SB, Pestana, BR, 1940. Infecção Natural de *Phlebotomus migonei* por Formas Leptomonas Provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Acta Medica de São Paulo*, 5: 106 – 111.

Peters, W, Killick-Kendrik, R, 1987. "The leishmaniasis in Biology and Medicine", Vol.1.p xiv. Academic Press, London.

Petrishcheva, A, Izyumskaya, NG. 1941. On breeding place of *Phlebotomus* in Sebastopol. *Abstract in Review of Applied Entomology*, 34: 78.

Pimenta, PF, Saraiva, EM, Rowton, E, Modi, GB, Garraway, LA, Beverley, SM, Turco, SJ, Sacks, DL, 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA*, 13;91(19):9155-6.

Pita – Pereira, D, Souza, GD, Zwetsh, A, Alves, CR, Britto, CC, Rangel, EF. 2009. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hig*, 80(4):593-5.

Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C, 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 107: 66–69

Pita – Pereira, D, Alves, CR, Souza, MB, Brazil, RP, Berttho, AL, de Figueiredo Barbosa, A, Britto, CC. 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(12):905-13.

Queiroz, RG, Vasconcelos, AW, Vasconcelos, Ide, A, de Sousa, RN, Pessoa, FA, de Alencar, JE, David, JR, 1991. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturite, Ceara State, northeast Brazil. *Parassitologia*, 33 Suppl:159-67.

Queiroz R G, Vasconcelos Ide A, Vasconcelos AW, Pessoa FA, de Sousa RN, David JR.1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in baturite municipality. *Am J Trop Med Hyg* ;50(6):693-8.

Rabello A, Orsini M, Disch J (2003) *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1: 17–28.

Ranasinghe S, Rogers ME, Hamilton JGC, Bates PA, Maingon RDC. 2008. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 875 — 882.

Rangel, EF & Lainson R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(7): 937-954.

Rangel EF, Lainson R, 2005. Ecologia das Leishmanioses. Rangel EF, Lainson R, eds. *Flebotomíneos do Brasil*. First edition. Fundação Oswaldo Cruz: Fiocruz, 291–337 [In Portuguese].

Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo AC. 1995. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 91(1):43-50

Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED 1992. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Viannia, 1991 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 235-238.

Rangel, EF, Azevedo, AC, Andrade, CA, Souza, NA, Wermelinger, ED. 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneousleishmaniasis in mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85(1):39-45.

Rangel, EF, Souza, NA, Wermelinger, ED, Azevedo, CRA, Barbosa, AF, Andrade, CATAL. 1986. Flebotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81: 347-349.

Rangel, EF, Souza, NA, Wermelinger, ED, Barboza, AF. 1984. Infecção Natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em Área Endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, 79(3): 395 - 396.

Ranque, P. 1973. Études morphologiques et biologiques de quelques Trypanosomides récoltes au Senegal. Tese para obtenção de grau de Doutor na Universidade de Aix-Marseilles, France. Apud Lainson R. & Shaw JJ.



Ray, DS. 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol. Cell. Biol*, 9: 1365-1367.

Ray R, Ghose AC. 1987. ELISA titres to polysaccharide antigens of *Leishmania donovani* promastigotes in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(6):998.

Rioux, JA, Lanotte, G, Serres, E, Pratlong, F, Bastien, P, Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasit Hum Comp*, 65: 111-125.

Ready PD, Smith DF, Killick-Kendrick R. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. *Med Vet Entomol* 1988; 2:109–16.

Rodgers, MR, Popper, SJ, Wirth, DF. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Exp Parasitol*, 71: 267-275.

Rodriguez, N, De Lima, H, Aguilar, CM, Rodriguez, A, Barker, DC, Convit, J. 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1:S105-9.

Rodriguez, N, Aguillar, CM, Barrios, MA, DC, Baker. 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans Soc Trop Med Hyg*, 93: 47-49.

Rodriguez, N, Guzman, B, Rodas, A, Takiff, H, Bloom, BR, Convit, J. 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2246-2252

Romero, GAS & Boelaert, M. 2010. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1): e584.

Ryan, KA. 1988. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol*, 42: 339-358.

Ryan, L. & Brazil, R.P. 1984. Leishmania infection in Lutzomyia longipalpis on the Island of São Luis, Maranhão State. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79:384

Sabroza, PC. 1981. O Domicílio como Fator de Risco na Leishmaniose Tegumentar Americana: Estudo Epidemiológico em Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

Sacks, DL, Perkins, PV. 1984. Identification of a infectiv stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223: 1417-1419.

Saf'janova, VM. 1982. Classification of the genus *Leishmania*. In Leishmaniasis. Protozoology, part 7, p. 200, Ross, ed. Leningrad:Academy of Science, U.S.S.R. all Union Society of Protozoologies, pp. 95-101.

Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. 2009. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 25(8): 383 – 391. Schlein, Y, Jacobson, RL, Shlomai, J. 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 22;245(1313):121-6.

Saliba, EK, Oumeish, OY. 1999. Reservoir host of cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 17: 275-279

Saliba, EK, Higashi, GI, Yates, JA. 1988. Cutaneous leishmaniasis in Jordan: Biochemical identification of human and *Psammomys obesus* isolates as *Leishmania major*. *Ann Trop Med Parasitol*, 82: 21-25.

Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV . 2010. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop*.;113(1):84-7.

Santos, E.; Almeida, B.A.M.; Souza, D.G.; Rangel, S.; Lammerhirt, B.C.; Cruz, L.; Bercht, B.D.; Fonseca, F.D. & Neto, A.R. 2005. Situação da Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul. Boletim Epidemiológico do Rio Grande do Sul. Ano 7, n.2.p.1-3.jun

Santos, SO, Arias, JR, Hoffmann, MP, Furtan, MBG, Ferreira, WF, Pereira, C, Ferreira, L. 2003. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, 36(5): 633-634

Santos, SO, Arias, J, Ribeiro, AA, Hoffmann, MP, Freitas, RA, Malacco, MAF. 1998. Incrimination of as *Lutzomyia cruzi* a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 315-317

Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. 2009. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 46(5):1159-63.

Saraiva, EM, Pimenta, PF, Brodin, TN, Rowton, E, Modi, GB, Sacks, DL, 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, 111 (Pt 3):275-87.

Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil . *Vet Parasitol*. 9;160(1-2):18-24.

Schlein, Y, Jacobson, RL, Messer, G. 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 15;89(20):9944-8.

Schlein Y, Schnur LF, Jacobson RL. 1990 Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 84(3):353-5.

Schneider P, Glaser TA. 1993 Characterisation of two soluble metalloexopeptidases in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 62(2):223-31.

.....

Schulz A, Mellenthin K, Schönian G, Fleischer B, Drosten C. 2003 Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 41(4):1529-35.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar, 2nd edn. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2005. Guia de vigilância epidemiológica, Brasília

SSMS - Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, Secretaria de Saúde do Estado 2006. Serviço de Vigilância Epidemiológica. SINAN/MS. Campo Grande. Available from: <http://www.saude.ms.gov.br/index>.

Sergent, ED. 1921. Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* scop.) *CR Acad. Sci*, 173:1030-1032.

Shapiro, TA, Englund, PT. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Ann. Rev. Microbiol*, 49:117-143.

Shaw, JJ. 1994. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present e Future Trends and Their Implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89: 471-478.

Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. 1987 Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 81(1):69-72.

Sherlock, IA. 1996. Ecological interaction of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91: 671-683.

Sherlock IA, Almeida SP. 1969 .Findings on kala-azar in Jacobina, Bahia. II. Canine leishmaniasis *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 21(3):535-9. [Artigo em Portugues]

Silva AM, de Camargo NJ, dos Santos DR, Massafera R, Ferreira AC, Postai C, Cristóvão EC, Konolsaisen JF, Bisetto A Jr, Perinazo R, Teodoro U, Galati EA 2008. Diversity,

distribution and abundance of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, Southern Brazil. *Neotrop Entomol* 37: 209-225.

Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CM, Carvalho IR, Brazil RP. 2002. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 44(3):145-9.

Silva, OS, Grunewald, J. 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(5):579-82.

Silveira FT, Souza AAA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EAY. 1991. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitousalis* (Psychodidae: Phlebotomine) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86:127-30.

Silveira, FT, Shaw, JJ, Braga, RR, Ishikawa, E. 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Para. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82(2):289-91

Simpson, L, Shaw, JJ. 1989. RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell*, 57: 355-66.

Simpson, L. 1987. The mitochondrial genome of Kinetoplastida: transcription, replication and evolution. *Ann Rev Microbiol*, 41: 363-382.

Simpson, L, Simpson, AG. 1978. Kinetoplast RNA of *Leishmania tarentolae*. *Cell*, 14(1):169-78.

Singenbergh JI, Gilbert M, de Balogh KI, Wint W 2004 Ecological sources of zoonotic diseases *Rev Sci Tech.*;23(2):467-84.

Siridewa K, Karunanayake EH, Chandrasekharan NV. 1996 Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples hydrocele fluid, and mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg*; 54:72-6.

Souza, MB, Marzochi, MC, de Carvalho, RW, Ribeiro, PC, Pontes, C dos S, Caetano, JM, Meira, A de M. 2003. Absence of *Lutzomyia longipalpis* in some endemic visceral leishmaniasis areas in Rio de Janeiro municipality. *Cadernos de Saúde Pública*, 19:1881-1885.

Souza MB, Cardoso PG, Sanavria A, Marzochi MCA, de Carvalho RW, Ribeiro PC, Ponte CS, Meira AM, Meródio JC 2003. Fauna flebotomínica do município de Bom Jardim, Região Serrana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 150-153.

Strelkova, MW, Eliseev, LN, Ponirovskii, EM. 1993. The isoenzyme identification of *Leishmania* isolates taken from greater gerbils, sandflies and human patients in foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmenistan. *Med Parasitol* 5: 34-37.

Sturm, NR, Simpson, L. 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*, 61: 879-884.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, Baneth G, 2010. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. Jan 12;4(1):e581.

Teodoro U, Santos DR, Santos AR, Oliveira O, Poiani LP, Silva AM, et al. 2006. Preliminary information on sandflies in the north of Paraná State, Brazil. *Revista Saúde Públ*; 40: 327—30.

Tesh, RB, Modi, GB. 1984. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 33: 41–46.

Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?1995. *Am J Trop Med Hyg*; 52 (3): 287 - 292

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E.1993. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp*; 68: 104 – 106

Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. 2008 *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of

Leishmania species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;61(1):23-30.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LMJ. 1994 .Discrimination amongst Leishmania by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *Eukaryot Microbiol*, 41(4):324-30

Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM.1991. Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol*. 72(2):157-63

Ullu, E., Tschudi, C. & Gunzl, A. 1996 Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. In *Molecular biology of parasitic protozoa* (ed. D. F. Smith & M. Parsons), pp. 115–133. Oxford: IRL Press.

van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB, 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 51(1):133-42

Viana, G. 1911. Sobre uma nova espécie de Leishmania (Nota Preliminar). *Bras. Méd*, 25: 411.

Walters, LL, Irons, KP, Chaplin, G, Tesh, RB. 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 30(4):699-718. Weigle 2002

Weigle, KA, Labrada, LA, Lozano, C, Santrich, C, et al.PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:601–606.

World Health Organization. Leishmaniasis: magnitude of the problem. World Health Organization, Geneva, 2009. http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html (Julho 2009, data de acesso).

World Health Organization 2000. The Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. *Fact Sheet*, 116: 1-5.

Wirth DF, Pratt DM.1982. Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;79(22):6999-7003.

World Health Organization. Rapport sur la Santé dans le Monde - 1998. *Technical Report Series*, 59-103. World Health Organization 1999. Leishmania-HIV coinfection South Western Europe 1990-1998 retrospective cases. *Wkly Epidemiol Rec*, 74: 365-375.

World Health Organization. 1990. Control of leishmaniasis. Report a WHO Expert Committee. Geneva. World Health Organization. *WHO Technical Report Series*, 793.

Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF, 2005. Rapid identification of Leishmania complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg*; 73(6):999-1004.

Wortmann G, Sweeney C, Houg H, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, Ockenhouse C, 2001. Rapid identification of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 65: 583–587.

Young, DG, Ducan, NA, 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst*, 54: 1-881.

Zilberstein, D, Dwyer, DM. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. 1988. *Biochem, J*. 15;256(1):13-21.

.....

9. Anexos



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

Daniela de Pita-Pereira^a, Carlos Roberto Alves^a, Marcos Barbosa Souza^b, Reginaldo Peçanha Brazil^a, Álvaro Luiz Bertho^c, André de Figueiredo Barbosa^d, Constança Carvalho Britto^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Leônidas Deane – sala 209, Avenida Brasil 4365, CP 926, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 22 February 2005; received in revised form 2 June 2005; accepted 3 June 2005
Available online 6 September 2005

KEYWORDS

Leishmania (Viannia) braziliensis;
Lutzomyia spp.;
PCR multiplex assay;
Dot blot analysis;
Non-isotopic hybridisation;
Brazil

Summary To identify naturally infected *Lutzomyia* spp. by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay was developed for the analysis of insect samples collected in distinct areas of the municipality of Rio de Janeiro (Brazil), from March to December 2003. Data from experimental infection indicate that the method can detect one individual infected insect out of ten. Wild sand flies were classified and grouped into pools of 10 specimens each, reaching a total of 40 female groups. Positive results were obtained with pools of *Lu. intermedia* (5/32) and *Lu. migonei* (3/5) collected in two areas from the district of Jacarepaguá presenting recent cases of human and canine leishmaniasis. Considering eight infected groups (8/40) with at least one positive insect in each, it was

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8232; fax: +55 21 2590 3495.
E-mail address: cbritto@ioc.fiocruz.br (C.C. Britto).

possible to infer an infection rate of 2%. This technique permits the synchronous processing of a large number of samples, in order to investigate infection rates in sand fly populations and to identify potential insect vectors. The results presented here represent the first molecular approach used to infer the natural infection index in both *Lutzomyia* spp. and constitute essential data to the understanding of leishmaniasis ecoepidemiology in endemic areas from Rio de Janeiro.

© 2005 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis affects millions of people in tropical areas of the world and presents a spectrum of clinical symptoms including cutaneous, mucocutaneous and visceral forms (WHO, 1990). In South America, including Brazil, the disease is mainly caused by *Leishmania amazonensis*, *Le. braziliensis* or *Le. guyanensis* (Grimaldi and Tesh, 1993; Lainson and Shaw, 1987). In Brazil, from 1982 to 2002 the Brazilian Ministry of Health recorded 4.75–22.94 cases of human American cutaneous leishmaniasis (ACL) per 100 000 inhabitants. In recent years, the disease has expanded to most Brazilian regions and is now spreading to the periphery of urban cities such as Manaus, Rio de Janeiro and Belo Horizonte, constituting a serious health problem (Grimaldi and Tesh, 1993; Marzochi, 1992; Marzochi and Marzochi, 1994).

Leishmania (*Viannia*) *braziliensis* is the flagellate parasite responsible for more than 26 000 new human cases of ACL annually in Brazil (FUNASA, 1999). The incidence of cutaneous leishmaniasis (CL) has increased markedly in the State of Rio de Janeiro (south-eastern Brazil), particularly during the last 30 years, as a consequence of innumerable factors involving environmental aggressions such as deforestation, forest fires, demographic invasions and real estate price speculations (Kawa and Sabroza, 2002). From 1985 to 2003, approximately 4867 cases of ACL were registered in the State of Rio de Janeiro and 1257 new cases in the municipality of Rio de Janeiro, including the areas selected for the present investigation surrounding the Massif of Pedra Branca in the district of Jacarepaguá (M.B. Souza, personal observation). Despite the important role of *Le. (V.) braziliensis* in tropical diseases, current knowledge regarding the identification of natural infection in sand fly vectors collected in Brazilian endemic areas is poor for conventional parasitological diagnosis and virtually nothing has been performed using molecular tools.

In the municipality of Rio de Janeiro, *Lutzomyia intermedia* presents the best vectorial potential

to transmit ACL in domiciliary and peri-domiciliary areas. This fact was attributed to its high density and anthropophilic adaptation to the man-modified environment (Carvalho et al., 1995). Indeed, up to now, only *Lu. intermedia* was found to be infected with *Le. (V.) braziliensis* in Rio de Janeiro (Rangel et al., 1984). As previously demonstrated, this species is well adapted to the surroundings in peri-domiciliary areas of the secondary forest (Gomes and Neves, 1998; Rangel et al., 1984). Furthermore, *Lu. migonei* may occur at a considerable density, being the second predominant phlebotomine species after *Lu. intermedia*, and could be incriminated as a potential secondary ACL vector in the region (Rangel et al., 1990). Until now, screening for natural infections in *Lu. intermedia* has been performed only by classical methods, such as insect dissection, microscopic analysis and isolation of flagellate parasites in culture (Rangel et al., 1984; Ryan et al., 1990; Vexenat et al., 1986). In addition, the possibility of other phlebotomine species being involved in the ACL transmission cycle in Rio de Janeiro must be considered.

The limiting factors for the existing techniques are their low sensitivities and the difficulty of processing the large number of samples required for epidemiological studies. In the last few years, molecular methods have been successfully applied to field studies on the vectorial competence of phlebotomine sand flies (Aransay et al., 2000; Rodriguez et al., 1999), even in areas with low rates of infection (Miranda et al., 2002; Silva and Grunewald, 1999).

The aim of the present investigation was to introduce the use of a PCR-based approach coupled to hybridisation with a biotinylated probe for the identification of sand fly vectors (*Lutzomyia* spp.) naturally infected by *Le. (V.) braziliensis*, collected in five different areas of the municipality of Rio de Janeiro (Brazil) where cases of human and canine leishmaniasis were recently described. The PCR procedure consisted of a multiplex assay that uses two primer pairs to amplify simultaneously the conserved region of kDNA minicircles from *Leishmania* as well as a constitutive gene (*cacophony*) specific

to phlebotomines of the *Lutzomyia* genus, which acts as an internal control for the PCR assay.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

The *Le. (V.) braziliensis* strain (MCAM/BR/98/619) was cultured in brain–heart infusion (BHI) medium supplemented with 10% fetal calf serum, 500 U/ml penicillin and 500 µg/ml streptomycin at 28 °C. Parasites were quantified by flow cytometry using an EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Cells were selected by cell sorting at different concentrations, in 96-well flat-bottomed microtitre plates (Nunc-Immuno Plate; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) containing 100 µl/well of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.2, 10 mM EDTA). Plates with promastigote cells were stored at –20 °C until use.

2.2. Experimental sand fly infection

The experimental infection assays were performed as previously described (Ward et al., 1978), with slight modifications. *Lutzomyia longipalpis* females were artificially infected by feeding through membranes on rabbit blood (inactivated at 56 °C) containing 2×10^7 *Le. (V.) braziliensis* promastigotes/ml. The percentage of infected female flies was estimated by midgut dissection in saline solution 6 days after feeding, under a stereoscopic microscope. The presence of promastigotes was determined by phase contrast microscopy. All microscopic fields were carefully examined for the presence of protozoa.

2.3. Selection of endemic areas

Wild sand flies were collected in five focal areas of CL surrounding the Massif of Pedra Branca, localised in the central portion of the municipality of Rio de Janeiro, in the district of Jacarepaguá (20°50'N and 43°20'W). The Park of Pedra Branca has an area of 12 398 ha corresponding to approximately 16% of the municipal territory, and represents the highest mountainous area of the city, formed by granitic and gneissic rocks, whose culminating point is Pedra Branca's Peak (1025 m). The Park of Pedra Branca was created in 1974 to preserve the remaining of the most important forest coverings of the municipality, Mata Atlântica. This region is still abandoned, with innumerable problems involving environmental aggres-

sions, such as inadequate agricultural practices, mineral exploitation, deforestation, forest fires, demographic invasions and real estate price speculations. The studied areas were Colônia Juliano Moreira, Pau da Fome, Cachamorra, Cabuçú and Lameirão Pequeno.

2.4. Sand fly capture and taxonomic identification

Capture was performed in the period March to December 2003 using CDC miniature light traps (Sudia and Chamberlain, 1962) placed around houses in the peri-domiciliary areas and annexes at 6:00 pm and removed at 7:00 am the following day. Adults were collected alive and transferred to labelled plastic containers. Afterwards, the insects were taken to the laboratory in FIOCRUZ, Rio de Janeiro, killed in the freezer and submitted to species identification. All specimens collected were identified based on their morphological characteristics according to the identification key proposed by Young and Duncan (1994). Following species characterisation, pools of 10 sand flies belonging to the same species were placed in 1.5 ml tubes containing 100 µl of TE buffer (pH 8.0). The material was stored at –20 °C until DNA extraction.

2.5. DNA extraction

DNA was extracted by incubating the pooled sand flies in 100 µl of TE buffer (pH 8.0) containing 100 µg/ml proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 2 h at 56 °C. Following centrifugation at $13\,000 \times g$, 4 °C for 15 min, the collected supernatant was heated at 95 °C for 15 min to inactivate proteinase K. The resulting samples were submitted to phenol–chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA pellets were re-suspended in 50 µl of $0.1 \times$ TE buffer (pH 8.0). Ten microlitre portions of DNA extracts were used for PCR amplification. Rigorous procedures were assumed to avoid possible contaminations, for example the inclusion of negative control groups (male sand flies) in the DNA extraction step and decontamination of instruments and working areas with diluted chloride solution and UV rays.

Total DNA was also obtained from cultured *Le. (V.) braziliensis* promastigotes, used as a positive control. Parasites were harvested in late log phase and washed in PBS prior to DNA isolation. After lysis in TE buffer containing proteinase K, DNA was extracted by phenol–chloroform and ethanol precipitation, as described above for the insect samples.

2.6. Hot-start PCR multiplex procedure

For the PCR multiplex assay, two primer pairs were used. The primers [5'-GGCCACTATATACACCAACCCC-3' and 5'-GGGGTAGGGCGTTCTGCGAA-3'] were employed to amplify the conserved region of kinetoplastic minicircle DNA from *Leishmania* spp. (Passos et al., 1996). The second primer pair amplifies the *cacophony* gene IVS6 region in sand flies of the neotropical genus *Lutzomyia*: 5Llcac [5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'] and 3Llcac [5'-CCACGAACAAGTTCA ACATC-3'] (Lins et al., 2002). The reactions were carried out in a final volume of 100 μ l containing 1 \times *Taq* polymerase buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP (Invitrogen), 0.2 μ M of each primer, 1.25 U *Taq Gold* DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 μ L DNA sample. The mixture was incubated in a Perkin-Elmer thermocycler (GeneAmp PCR System 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 94 °C for 12 min for enzyme activation (hot-start PCR), followed by 35 cycles, each consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C. After the last cycle, the extension was continued for a further 10 min at 72 °C. Ten microlitres of the amplification reaction product were resolved in 2% agarose gel electrophoresis and visualised under UV transillumination.

2.7. Dot blot analysis to detect *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection in sand flies

The amplified products were also analysed by dot blot hybridisation using a *Le. (Viannia)*-specific biotinylated probe [5': TAATTGTGCACGGGAGGCCA] (Fernandes et al., 1996). Briefly, the amplified products (10 μ l) were denatured in 0.4N NaOH before application to nylon membranes (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), using a manifold vacuum device (Bio-Dot™; BioRad, Richmond, CA, USA). After addition of the biotinylated probe (5 ng/ml), hybridisation reactions were performed overnight at 46 °C in BLOTTO (1.5 \times saline–sodium–citrate buffer containing 1% sodium dodecylsulfate, 0.5% skim milk). Filters were washed five times using 0.05% Tween-20 (BioRad) in PBS–Tween-20, at 25 °C for 5 min each, before incubation with a streptavidin–peroxidase conjugate diluted 1:100 (Sigma, St Louis, MO, USA) in the same buffer at 25 °C for 1 h. The membranes were then washed five times with PBS–Tween-20, each time for 5 min at 25 °C, before being equilibrated with detection buffer (0.5 mM citrate–phosphate buffer pH 5). Hybridisation reactions were revealed with the addition

of 2% diaminobenzidine (DAB; Sigma) and 30% H₂O₂ (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA).

2.8. Statistical analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were used with the software StatXact version 3–3.1 (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA, USA) to compare differences between the distribution of phlebotomine species in the investigated areas and the natural infection index of captured insects. Statistical analyses were also performed to investigate the relationship between wild insects that have been recently fed and positive PCR results for infection with *Le. (V.) braziliensis*. The data were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Hot-start PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay for the detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* kDNA

The PCR assay performed in this work was based on amplification of the conserved region of kDNA minicircles from *Leishmania* spp. (Passos et al., 1996). However, some adaptations were introduced to control for eventual inhibition in the amplification reactions that could generate false negative results. For this purpose, we included a second pair of primers that amplify a constitutive gene of the *Lutzomyia* genus, adjusting the best annealing temperature (55 °C). The PCR multiplex-based detection system was able to amplify simultaneously a fragment of 120 bp from the *Leishmania* genus (kDNA conserved regions) and a specific sequence from sand flies belonging to the subgenus *Lutzomyia* (*cacophony* gene), generating a 220 bp product. We demonstrated that the *cacophony* gene would act as an important internal control for the DNA polymerase enzyme activity. The sensitivity and effectiveness of the hot-start PCR multiplex were demonstrated by using different concentrations of parasites in reconstituted samples consisting of pools formed by 10 male sand flies (*Lu. longipalpis*) in the presence of 1–10⁵ *Le. (V.) braziliensis* promastigotes. The results obtained either by the PCR multiplex alone (gel electrophoresis analysis) or after the subsequent non-isotopic hybridisation step allowed DNA detection corresponding to only one parasite present in the pool of 10 male insects.

After optimisation, the method was validated with another type of simulation representing experimental infection assays that consisted of pools formed by 10 laboratory-bred *Lu. longipalpis*

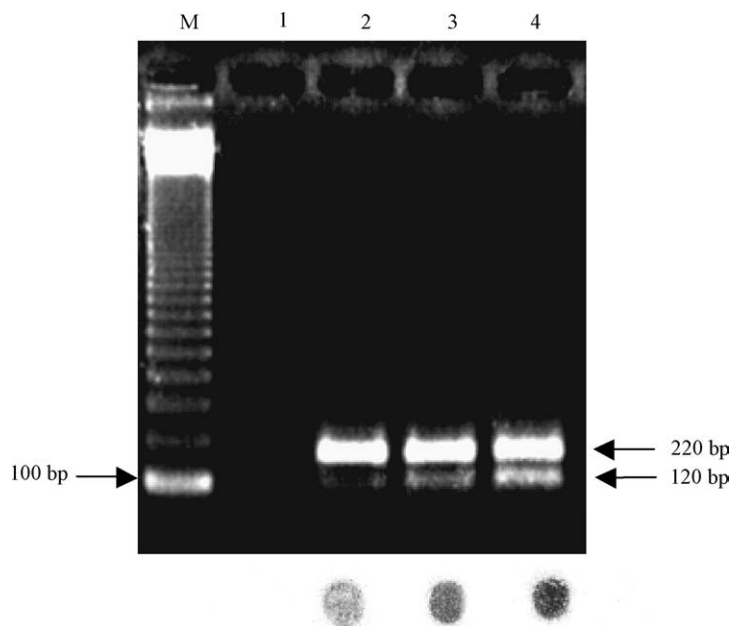


Figure 1 Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in experimentally infected phlebotomines. Infected *Lutzomyia* females were grouped with non-infected specimens constituting three pools of 10 insects each. The PCR multiplex was performed with DNA extracted from these pools. The upper part of the figure shows the ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel on which the amplicons were electrophoresed. The 220 bp product represents the *cacophony* gene amplification (*Lutzomyia* genus); the 120 bp fragment corresponds to the conserved region of kinetoplast minicircles from *Leishmania* spp. M, molecular weight marker (100 bp DNA ladder). Lane 1, amplification reaction without added DNA; lanes 2–4, the three pools formed in the following proportions, respectively (infected/non-infected): 1/9, 5/5 and 9/1. The bottom part shows the dot hybridisation result using a biotinylated probe specific for parasites from the *Viannia* subgenus followed by enzymatic revelation, aligned with the top photograph.

females fed with reconstituted blood containing infective *Le. (V.) braziliensis* promastigotes. Thus, three pools were created: (i) one infected insect and nine uninfected; (ii) five infected insects and five uninfected; and (iii) nine infected insects and one uninfected. The PCR multiplex results showed, in all three simulations, the detection of both amplification products visualised after gel electrophoresis, and the DNA from *Le. (V.) braziliensis* was confirmed in all cases by means of a specific signal generated through DAB precipitation after hybridisation with the biotinylated probe (Figure 1). In these experiments we could demonstrate the viability of the method to identify one individual infected female phlebotomine in a pool of ten.

3.2. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in wild sand flies collected in endemic areas of the municipality of Rio de Janeiro

Data regarding the analysis of sand fly insects from each studied area are summarised in Table 1. A total of 16 415 specimens (12 547 males and 3868

females) were collected from March to December 2003 in five different localities of the municipality of Rio de Janeiro with recent cases of human and canine leishmaniasis. Four species were identified, with the most frequent being *Lu. intermedia* (78.34%), followed by *Lu. migonei* (12.9%) and *Lu. longipalpis* (8.22%); *Lu. cortelezzii* represented the least frequent species (0.54%). When the data were analysed in absolute numbers, the locality of Lameirão Pequeno showed the highest density of sand flies collected, followed by Pau da Fome, Colônia Juliano Moreira, Cabuçu and Cachamorra. The concentrated distribution of phlebotomines in the studied areas was associated with the higher prevalence of one species in each studied area ($\chi^2 = 1.394 \times 10^4$; $P < 0.05$).

From the total number of specimens collected, only a smaller sample ($n=910$) was sent to the laboratory for PCR assay and hybridisation. Those insects were analysed in samples of 10 sand flies each from the same species, consisting of 51 male and 40 female pools (Table 1). Male insect groups were used only as negative controls for the DNA extraction procedure, as a way to control for eventual contamination in the PCR analysis. Positive female pools were evidenced when PCR products

Table 1 Distribution of sand fly specimens collected in five distinct areas from the municipality of Rio de Janeiro, Brazil, between March and December 2003; number of phlebotomine pools submitted to the molecular diagnostic evaluation for infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and positive PCR hybridisation results with female pools from the field^a

Locality	Species of phlebotomine														
	<i>Lu. intermedia</i> (M/F)			<i>Lu. migonei</i> (M/F)			<i>Lu. longipalpis</i> (M/F)			<i>Lu. cortelezzii</i> (M/F)			Total (M/F)		
	T	P	P	T	P	P	T	P	P	T	P	P	T	P	P
Cabuçu	400/48	2/2 ⁰	—	159/35	—	—	360/19	12/0	30/54	0/1 ⁰	—	949/156	14/3 ⁰	—	—
Cachamorra	—	—	—	1/0	—	—	682/83	4/1 ⁰	1/1	—	—	684/84	4/1 ⁰	—	—
Colônia Juliano Moreira	3081/1278	6/16 ³	—	51/19	2/1 ¹	—	—	—	—	—	—	3132/1297	8/17 ⁴	—	—
Lameirão Pequeno	3872/900	16/3 ⁰	—	290/27	—	—	9/2	—	0/2	—	—	4171/931	16/3 ⁰	—	—
Pau da Fome	2179/1102	3/11 ²	—	1275/261	5/4 ²	—	157/37	1/1 ⁰	—	—	—	3611/1400	9/16 ⁴	—	—
Total	9532/3328	27/32 ⁵	—	1776/342	7/5 ³	—	1208/141	17/2 ⁰	31/57	0/1 ⁰	—	12 547/3868	51/40 ⁸	—	—

T: total number of phlebotomine specimens collected in each locality classified by gender and species; P: pools formed by ten insects from the field belonging to the same species, classified by gender.

^a The number of positive female pools in the PCR multiplex hybridisation assay is in superscript.

were submitted to hybridisation with the specific *Viannia* subgenus probe. The results revealed that 8 of 40 (20%) female pools were positive, corresponding to the DAB precipitation signal detection revealed by enzymatic reaction. Moreover, we observed that this positivity index was related exclusively to *Lu. intermedia* and *Lu. migonei* collected in Colônia Juliano Moreira and Pau da Fome regions (Table 1).

Considering all the *Lu. intermedia* female pools assayed in the PCR hybridisation detection system, only 5 of 32 were found to be positive (15.6%): two collected in Pau da Fome and three from Colônia Juliano Moreira. These data demonstrated a positivity of 18.2% (2/11) and 18.8% (3/16) for each locality, respectively. The results obtained with the *Lu. migonei* pools ($n=5$) revealed three of them (60%) to be positive for infection with *Leishmania* spp. from the *Viannia* subgenus. In this case, the infection index was 100% (1/1) in Colônia Juliano Moreira and 50% (2/4) in Pau da Fome (Table 1). Despite the limited number of pools tested, statistical analysis regarding the total number of sand fly specimens naturally infected in both areas (4/16 for Pau da Fome; 4/17 for Colônia Juliano Moreira) indicated no significant differences between the two studied areas ($P=0.8379$).

Taking into account that each positive pool contained at least one infected insect and that 20% (8/40) of pools were positive, we can infer that 2% of the evaluated specimens were naturally infected with *Le. (V.) braziliensis*. We also demonstrated that this percentage of infection occurred in localities where recent cases of ACL were detected.

An additional analysis of these data was made with the intention to correlate sample positivity with the fact that the insects have recently been fed with blood. This evaluation was possible because at the time of microscopic analysis for species classification we could identify the blood content of each sand fly. From a total of eight positive pools detected by PCR hybridisation, only one representing *Lu. intermedia* had recently fed (data not shown). Statistical analysis of these data revealed no relationship between phlebotomines recently fed and positive results for infection ($P=0.9379$).

4. Discussion

The control of leishmaniasis in endemic areas requires knowledge of the geographic distribution of *Leishmania* spp. through the identification of reservoir hosts and potential vector species involved in parasite transmission. In most epidemi-

ological studies, when a sand fly is found to be naturally infected there is an urgent need for accurate identification of the *Leishmania* spp. in order to establish a true vector–parasite relationship in nature. The most commonly used method is the laborious and time-consuming search for the parasite in loco, after dissection of the insect digestive tract. Moreover, in putative positive cases, the infection has to be confirmed by in vitro culture of *Leishmania*, often susceptible to contamination, or by inoculation into laboratory animals, as other non-identified flagellates are commonly found in the insect midgut (Rodriguez et al., 1994; Tesh and Modi, 1984).

With the improvement of DNA-based techniques, molecular approaches have been used as potential tools for the accurate detection and identification of *Leishmania* within wild sand fly vectors (Barker, 1989; Silva and Grunewald, 1999). In this scenario, the PCR assay has been the most commonly used with entomological samples from different geographic areas (Aransay et al., 2000; Feliciangeli et al., 1994; Jorquera et al., 2005; Perez et al., 1994). Some of these protocols include a hybridisation step using specific radiolabelled probes to assure the parasite detection identity (Miranda et al., 2002; Rodriguez et al., 1999). The main advantages of molecular methods are their sensitivity and specificity, independent of the number, stage and localisation of the parasite in the insect midgut (Perez et al., 1994). In fact, the increase in sensitivity using PCR-based detection systems has already been described in distinct areas with recent leishmaniasis cases: 1.3% in Sucre, Venezuela (Jorquera et al., 2005); 1.1% in Urana and Puerto Cabello, Venezuela (Feliciangeli et al., 1994); 1.1% in Chaute, Peru (Perez et al., 1994); and 0.4% in the State of Bahia, Brazil (Miranda et al., 2002). Despite technological efforts, these diagnostic procedures have not yet been introduced for the identification of infected sand flies collected in endemic areas from Rio de Janeiro, Brazil.

In the present study, the developed PCR multiplex coupled to dot blot non-isotopic hybridisation is very specific for the identification of *Le. (V.) braziliensis* infection in wild sand flies (*Lutzomyia* genus) caught in five different localities from the municipality of Rio de Janeiro. Dot blot hybridisation is ideally suited for the analysis of multiple samples and, in addition, the use of a non-radioactive probe offers an advantage over the usual limitations of working with radioisotopes. For the PCR multiplex, two primer pairs were used, allowing the simultaneous detection of DNA from *Leishmania* (universal primers based on kDNA) and *Lutzomyia* spp. (*cacophony* gene-based primers).

The assay was proposed since it is known that inhibitory effects can interfere in the PCR when the aim is the analysis of complex biological material. For this reason, we introduced a primer pair targeting a constitutive gene from *Lutzomyia* spp. as an internal control for the PCR amplification, thus avoiding false negative results. The difficulty in establishing a correct diagnosis might be one of the reasons why the incidence of phlebotomine infections in the New World has been underestimated (Ashford et al., 1991). Previous reports have shown that sand fly infectivity rates in nature are low (0.2–2%), making finding the parasite difficult (Miranda et al., 2002; Rodriguez et al., 1999). In this sense, the establishment of a PCR multiplex procedure that is able to control the DNA amplification performance seems to be a more reliable tool for diagnostic purposes. In this study, all sand fly samples from the field revealed the 220 bp fragment corresponding to *cacophony* gene amplification after gel electrophoresis analysis.

The use of male sand fly mixtures spiked with different concentrations of *Le. (V.) braziliensis* promastigotes permitted the sensitivity of the detection system to be evaluated. Theoretically, only one parasite is sufficient to be detected by PCR (De Bruijn and Barker, 1992), even in the presence of an excess of phlebotomine DNA, as confirmed herein. It is important to emphasise that parasite quantification using flow cytometry approach (cell sorting) represents a consistent method for isolating only one cell when the aim is to establish the minimum number of promastigotes detected in reconstituted samples. Considering that those experiments do not represent the real situation in nature, the proposed methodology was validated through the establishment of experimental infections. The PCR-based assay was able to identify the 120 bp fragment corresponding to *Leishmania* kDNA in all pools, including the pool consisting of a single experimentally infected *Lu. longipalpis* specimen in the presence of nine non-infected ones.

Despite the fact that we do not know the natural degree of infection of one individual insect, in those experimental infections the number of parasites might be greater than that found in natural situations. Analysis of wild sand flies has shown that the positivity index for infection was related to two predominant species collected: *Lu. intermedia* and *Lu. migonei*. These findings corroborate the ecological prevalence of those phlebotomines in modified environments (Rangel et al., 1984). In a recent investigation carried out in the same studied areas, Souza et al. (2003) described a similar pattern for the geographic distribution of both species.

ACL related to *Le. (V.) braziliensis* is a well-known occurrence in the State of Rio de Janeiro (Grimaldi and Tesh, 1993; Marzochi, 1992; Marzochi and Marzochi, 1994), with *Lu. intermedia* being the species with the greatest vectorial potential (Marcondes et al., 1997). In our study, *Lu. intermedia* and *Lu. migonei* pools positive for infection with *Le. (V.) braziliensis* were detected in two localities, Colônia Juliano Moreira and Pau da Fome, where recent ACL cases in humans and dogs have been diagnosed. The data suggest the possible involvement of both phlebotomine species in the ACL transmission chain in those areas. The same proposal was considered in a previous study, in which the frequency of sand fly vectors was correlated with human cases of ACL in Ilha Grande, Rio de Janeiro (M.B. Souza, personal observation).

Our data reinforce the idea that insect captures directed to areas presenting recent leishmaniasis cases were able to find infected sand flies, suggesting a possible effect of *Lutzomyia* spp. infection rates in human disease (Felicangeli and Rabinovich, 1998; Miranda et al., 2002). The analysis revealed that 2% of the evaluated female specimens (8/400) were found to be infected with *Le. (V.) braziliensis*, if a minimum amount of one phlebotomine is to be considered *Leishmania* positive per sample, as inferred by our experimental conditions. This likely underestimated overall infection rate was 11 times higher than the one previously suggested using manual dissection in an endemic area from the State of Rio de Janeiro (Rangel et al., 1984). Despite the small sample analysed, the infection index of 2% was comparatively high compared with the average rate found in other studied areas with recent leishmaniasis cases (Felicangeli et al., 1994; Jorquera et al., 2005; Miranda et al., 2002; Perez et al., 1994). This result can in part be explained by the introduction of methodological changes in our molecular procedure, for instance the establishment of a PCR multiplex approach to control for potential inhibitor elements.

Another interesting result refers to the identification of *Lu. migonei* naturally infected by *Le. (V.) braziliensis*; data not yet evidenced in endemic areas from Rio de Janeiro. The first evidence for *Lu. migonei* infection was described in the State of São Paulo, through the identification of parasites, possibly *Leishmania*, in the sand fly midgut (Pessoa and Coutinho, 1949). In a more recent epidemiological trial, the presence of *Le. (V.) braziliensis* infecting *Lu. migonei* was observed in Baturité, State of Ceará (Azevedo and Rangel, 1991; Azevedo et al., 1990; Queiroz et al., 1991).

The results presented here correspond to the first natural infection analysis using a DNA-based

approach to identify phlebotomines involved in the transmission cycle of ACL in the State of Rio de Janeiro. A prevalence of approximately 2% for *Le. (V.) braziliensis* infection represents a relatively high index compared with other studies that use traditional methods. In addition, more information regarding the distribution of this parasite in the phlebotomine fauna is essential to understand the leishmaniasis ecoepidemiology and to draw control measures against the disease.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest regarding the work reported in this paper.

Acknowledgements

Dr Elizabeth Rangel for the laboratory support in the experimental infections; Dr Raquel Pacheco and Marise Pires for technical support in the hybridisation assays; Maria Angelica Cardoso for assistance with optimising the PCR approach; and Dr Elisa Cupolillo and Fátima Madeira for parasite supply (IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). This investigation was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Brasil. Constança Britto is a fellow of the CNPq Institution.

References

- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933–1938.
- Ashford, R.W., Desjeux, P., de Raadt, P., 1991. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis. *Immunol. Today* 8, 104–105.
- Azevedo, A.C., Rangel, E.F., 1991. A study of sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 405–410.
- Azevedo, A.C., Rangel, E.F., Queiroz, R.G., 1990. *Lutzomyia migonei* (Franca 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85, 479.
- Barker, D.C., 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99, S125–146.
- Carvalho, R.W., Serra-Freire, N.M., Souza, M.B., 1995. Fauna de flebotomos da Ilha do Araújo, Município de Paraty, RJ. Diversidades e aspectos do comportamento. *Parasitologia Al Dia* 19, 104–112.
- De Bruijn, M.H., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast. *Acta Trop.* 52, 45–58.
- Felicangeli, M.D., Rabinovich, J., 1998. Abundance of *Lutzomyia ovallesi* but not *Lu. gomezi* (Diptera: Psychodidae)

- correlated with cutaneous leishmaniasis incidence in North-Central Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* 12, 121–131.
- Feliciangeli, M.D., Rodriguez, N., Bravo, A., Arias, F., Guzman, B., 1994. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-Central Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* 8, 317–324.
- Fernandes, O., Bozza, M., Pascale, J.M., de Miranda, A.B., Lopes, U.G., Degraive, W.M., 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 279–284.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde), 1999. Informe epidemiológico do SUS 7, 86–87.
- Gomes, A.C., Neves, V.L.F.C., 1998. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 553–558.
- Grimaldi Jr, G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230–250.
- Jorquera, A., González, R., Marchán-Marcano, E., Oviedo, M., Matos, M., 2005. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 45–48.
- Kawa, H., Sabroza, P.C., 2002. [Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro]. *Cad. Saúde Pública* 18, 853–865 [in Portuguese].
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution, in: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. I. Biology and Epidemiology. Academic Press, London, pp. 1–120.
- Lins, R.M., Oliveira, S.G., Souza, N.A., de Queiroz, R.G., Justiniano, S.C., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. *Insect Mol. Biol.* 11, 117–122.
- Marcondes, C.B., Day, J.C., 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.
- Marzochi, M.C.A., 1992. Leishmanioses no Brasil. *J. Bras. Med.* 63, 82–104.
- Marzochi, M.C.A., Marzochi, K.B., 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil — emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública* 10, 359–375.
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Gonçalves, M., Reis, M.G., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-Netto, M., Barral, A., 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 185–188.
- Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M., Fernandes, O., Degraive, W., 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 19–20.
- Perez, J.E., Ogusku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., Nieto, E., Arevalo, J., Guerra, H., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 1614.
- Pessoa, S.B., Coutinho, J.O., 1949. Infecção natural de *Phlebotomus migonei* por formas leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Rev. Biol. Hyg.* 10, 139–142.
- Queiroz, R.G., Vasconcelos, A.W., Vasconcelos, A., de Sousa, R.N., Pessoa, F.A., de Alencar, J.E., David, J.R., 1991. Phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. *Parassitologia* 33, 159–167.
- Rangel, E.F., Souza, N.A., Wermelinger, E.D., Barboza, A.F., 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 395–396.
- Rangel, E.F., Azevedo, A.C., Andrade, C.A., Souza, N.A., Wermelinger, E.D., 1990. Studies on sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85, 39–45.
- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R., Convit, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 9, 2246–2252.
- Rodriguez, N., Aguillar, C.M., Barrios, M.A., Baker, D.C., 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 47–49.
- Ryan, L., Vexenat, A., Marsden, P.D., Lainson, R., Shaw, J.J., 1990. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 786.
- Silva, O.S., Grunewald, J., 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 579–582.
- Souza, M.B., Marzochi, M.C., de Carvalho, R.W., Ribeiro, P.C., Pontes, C.S., Caetano, J.M., Meira, A.M., 2003. Absence of *Lutzomyia longipalpis* in some endemic visceral leishmaniasis areas in Rio de Janeiro municipality. *Cad. Saúde Pública* 19, 1881–1885.
- Sudia, W.A., Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap: an improved model. *Mosq. News* 22, 126–129.
- Tesh, R.B., Modi, G.B., 1984. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 41–46.
- Young, D.G., Duncan, N.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54, 1–881.
- Vexenat, J.A., Barretto, A.C., Cuba, C.C., Marsden, P.D., 1986. Epidemiological characteristics of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the State of Bahia. III. Phlebotomine fauna. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81, 293–301.
- Ward, R.D., Lainson, R., Shaw, J.J., 1978. Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sand flies (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 269–276.
- WHO, 1990. Control of Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Technical Report Series, No. 793.



Short communication

Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay

Daniela de Pita-Pereira^a, Maria Angelica Batista Cardoso^a, Carlos Roberto Alves^a, Reginaldo Peçanha Brazil^b, Constança Britto^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Leônidas Deane, sala 209, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2007

Received in revised form 16 April 2008

Accepted 17 April 2008

Available online 25 April 2008

Keywords:

Leishmania infantum chagasi

Sand fly

Lutzomyia cruzi

Lutzomyia forattinii

PCR multiplex

Natural infection

Brazil

ABSTRACT

In order to identify *Lutzomyia* spp. naturally infected by *Leishmania* parasites a PCR multiplex assay coupled to non-isotopic hybridization was used for the analysis of insect samples collected by CDC light traps in an endemic area of visceral leishmaniasis (VL) in the municipality of Corumbá, Mato Grosso do Sul State, Brazil in May/June 2006. Wild sand flies were identified and grouped into pools of 10 female specimens and 27 groups in total were collected. Positive results were obtained from *Lutzomyia cruzi* (2 out of 13 pools) and *Lutzomyia forattinii* (1 out of 14 pools). The positive pools were confirmed as being infected by *Leishmania infantum chagasi* after hybridizing the PCR products with a species-specific biotinylated probe derived from the kinetoplast minicircle conserved sequence. Given that we detected infection in 3 out of 27 groups and that there was at least 1 infected insect in each, it was possible to infer an infection rate of 1.5% for *Lu. cruzi* and 0.7% for *Lu. forattinii* in the analyzed samples. These results confirm the vectorial role of *Lu. cruzi* in transmitting *L. infantum chagasi* and suggest *Lu. forattinii* as a potential VL vector in the municipality of Corumbá, where notifications of the disease in humans and dogs have increased over the last two decades.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in several Latin American countries and the disease was classically observed in the northeast of Brazil (Deane and Deane, 1962). In the past two decades the re-emergence and urbanization of VL in Brazil has led the disease to become one of the major health problems in the country (Arias et al., 1996; Lainson and Rangel, 2005), where *Leishmania infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 is the etiologic agent and *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) acts as primary vector (Deane and Deane, 1962; Lainson and Rangel, 2005).

In the State of Mato Grosso do Sul, VL was reported as early as 1911 with sporadic human cases. Since then, there has been an increase in the number of VL notifications, and spread to new areas so that it can actually be considered as being endemic in several regions within Mato Grosso do Sul (Arruda et al., 1949; Arias

et al., 1996; Oliveira et al., 2006). The municipality of Corumbá in the northwest of the State represents one of these endemic areas with active transmission of canine and human visceral leishmaniasis. Although three males of *Lu. longipalpis* were found in 2001 in Corumbá (Santos et al., 2003), other entomological studies have not demonstrated its presence in the area (Galati et al., 1985, 1997; Brazil et al., 2002). The predominance of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) and *Lutzomyia forattinii* (Galati et al., 1985) and their anthropophily suggested a possible participation of both sand fly species in the transmission of the disease in Corumbá (Galati et al., 1997). Moreover, the finding of natural *Leishmania* infection in *Lu. cruzi* strongly supported its identification as a VL vector in this region (Santos et al., 1998).

In this study, a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay was used to evaluate natural infection rates of sand flies captured in a peri-domiciliary area in the municipality of Corumbá by *Leishmania* spp. The data presented here confirm previous findings regarding the participation of *Lu. cruzi* in the transmission of *L. infantum chagasi*, and describe for the first time the occurrence of natural infection by this parasite in *Lu. forattinii*, bringing a

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8232; fax: +55 21 2590 3495.
E-mail address: cbritto@ioc.fiocruz.br (C. Britto).

better understanding of the eco-epidemiology of leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Sand fly capture and taxonomic identification

Sand flies were collected in May/June 2006 with CDC light traps (Sudia and Chamberlain, 1962) placed in a pigpen of a peridomicile (19°01'75"S, 57°08'33"W), in Cristo Redentor district of Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Alive insects were transferred to labelled containers, taken to the laboratory and killed in the freezer. Using a stereoscopic microscope, pools of 11 individuals were usually performed based on their external coloration (dark in *Lu. cruzi* and completely pale in *Lu. forattinii*). Afterwards, one specimen from each pool was randomly taken and slide-mounted in Canada Balsam to confirm the identification using Young and Duncan's keys (1994).

Females of *Lu. longipalpis* and *Lu. cruzi* are morphologically similar. However, in the present study the absence of *Lu. longipalpis* males and the capture of 180 males of *Lu. cruzi* has led us to consider the females as belonging to this latter species.

2.2. DNA extraction and PCR multiplex-dot blot hybridization

Pools of 10 specimens belonging to the same species were conditioned in 1.5 mL tubes containing 100 µL of TE buffer (pH 8.0) and stored at –20 °C until DNA extraction. DNA was extracted as previously described (Pita-Pereira et al., 2005) and rigorous procedures were assumed in order to control potential contamination, e.g. we included negative control groups (male sand flies) in the DNA extraction step and decontaminated instruments and working areas with diluted chloride solution and ultraviolet light.

For the PCR multiplex assay, two primer pairs were used. The primers [5'-GGCCACTATATTACACCAACCC-3' and 5'-GGGGTAGGGCGTTCTGCGAA-3'] were employed to amplify the conserved region of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania* spp. (Passos et al., 1996). The second primer set amplifies the *cacophony* gene IVS6 region in sand flies of the Neotropical genus *Lutzomyia*: 5Llcac [5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'] and 3Llcac [5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3'] (Lins et al., 2002). The reactions were carried out in a final volume of 100 µL containing 1× *Taq* polymerase buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Invitrogen), 0.2 µM of each primer, 1.25 U *Taq Gold* DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 µL DNA sample. The mixture was incubated in a PerkinElmer thermocycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) at 94 °C for 12 min for enzyme activation (hot-start PCR), followed by 35 cycles, each consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C, and a final extension step for 10 min at 72 °C. Ten microliters of the amplification product were resolved on 2% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet transillumination following ethidium bromide staining.

The amplified products were also analyzed by dot blot hybridization using a *L. infantum*-specific biotinylated probe [5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'] designed to an internal sequence of the kDNA minicircle conserved region (Francino et al., 2006). The amplicons (10 µL) were denatured in 0.4N NaOH before application to nylon membranes (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), using a manifold vacuum device (Bio-Dot™; BioRad, Richmond, CA, USA). Pre-hybridization was performed at 60 °C for 3 h in BLOTTO solution (1.5× saline-sodium-citrate buffer containing 1% sodium dodecylsulfate, 0.5% skimmed milk). After addition of the biotinylated probe (5 ng/mL), hybridization reac-

tions were performed overnight at 46 °C in the same BLOTTO solution. Filters were washed five times using 0.05% Tween-20 (BioRad) in PBS, at 25 °C for 5 min each, before incubation with a streptavidin-peroxidase conjugate diluted 1:100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) in the same buffer at 25 °C for 1 h. The membranes were then washed five times with PBS-Tween-20 solution at 25 °C for 5 min. Hybridization reactions were revealed by using Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

3. Results and discussion

One important step towards the incrimination of *Leishmania* vectors is the report of the occurrence of naturally infected sand flies (Killick-Kendrick and Ward, 1981). In most epidemiological studies, accurate knowledge of the *Leishmania* parasite and its vector species can result in an appropriate intervention when transmission is taking place in a given area. Although sand fly digestive tract dissection is the method most commonly used to reveal the rate of natural infections in endemic areas, it is laborious and time-consuming. Another limiting factor is the difficulty of processing the large number of samples that would be required for epidemiological investigations (Aransay et al., 2000; Perez et al., 2007). Alternatively, molecular techniques allow for DNA detection of a single *Leishmania* parasite (Pita-Pereira et al., 2005) and probably represent a more sensitive tool than manual dissection and microscopic examination (Nascimento et al., 2007), which in cases of low parasitaemia, may give underestimated scores of natural sand fly infection rates. Moreover, in putative positive cases revealed by sand fly gut dissection, the infection has to be confirmed by *in vitro* culture of parasites (often susceptible to contamination), or by inoculation into laboratory animals, as other non-identified flagellates are commonly found in the insect midgut (Ryan and Brazil, 1984; Freitas et al., 2002).

The use of PCR for detection of *Leishmania* DNA in wild sand flies is a useful technique to identify putative leishmaniasis vectors in different geographic areas (Silva and Grunewald, 1999; Aransay et al., 2000; Miranda et al., 2002; Pita-Pereira et al., 2005; Perez et al., 2007). The main advantages of molecular methods are their sensitivity and specificity, independent of the number, stage and localization of the parasite in the insect midgut (Perez et al., 1994). In a previous study we developed a PCR multiplex assay coupled to dot blot non-isotopic hybridization, yielding a highly specific procedure for the identification of *Leishmania* (*V. braziliensis*) infection in wild *Lutzomyia* from the municipality of Rio de Janeiro, Brazil (Pita-Pereira et al., 2005). The same methodology was applied in this study.

A total of 450 specimens (180 male and 270 female insects) were collected from the end of May to June 2006, in the district of Cristo Redentor in the municipality of Corumbá, where recent cases of human and canine visceral leishmaniasis have been reported. Two species of sand flies were identified, the most frequent being *Lu. cruzi* (55.6%) followed by *Lu. forattinii* (44.4%).

These insects were analyzed in groups of 10 sand flies, from the same species; in total 18 male and 27 female groups. The male insect groups were used only as negative controls for the DNA extraction step and as a way to verify eventual contamination in the PCR analysis (Pita-Pereira et al., 2005). Positive female groups were confirmed as infected by *L. infantum chagasi* when the PCR products were subjected to hybridization with a specific probe (Fig. 1). Three out of 27 (11%) female groups were positive, 2 of them being *Lu. cruzi* and the other of *Lu. forattinii*. Thus, if one infected insect occurred in each of these three groups, the minimal infection rate for *Lu. cruzi* and *Lu. forattinii* was 1.5 and 0.7%, respectively. Interestingly, one positive group from each *Lutzomyia* spp. could be detected prior to

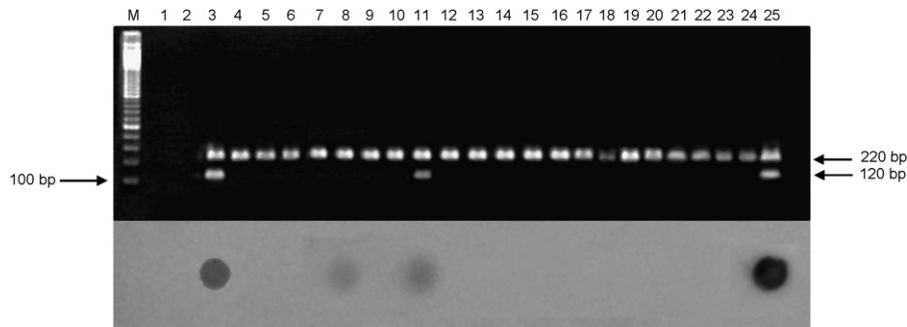


Fig. 1. Detection of *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* collected in the municipality of Corumbá, Mato Grosso do Sul State, Brazil. The phlebotomines were grouped into pools of 10 female specimens and PCR multiplex was performed with total DNA extracted from these groups. The upper part of the figure shows an ethidium bromide-stained 2% agarose gel on which the amplicons were submitted to electrophoresis. The 220 bp product represents the *cacophony* gene amplification (*Lutzomyia* genus); the 120 bp fragment corresponds to the conserved region of kinetoplast minicircles from *Leishmania* spp. M, molecular weight marker (100 bp DNA ladder). Lanes 1 and 2, amplification reactions without added DNA (PCR negative controls); lane 3, *Lu. forattinii* positive pool; lane 11, *Lu. cruzi* positive pool; lanes 4–10 and 12–20 represent not-infected wild sand fly pools; lanes 21–24, negative controls for DNA extraction step (male insect groups); lane 25, PCR positive control (DNA extracted from a mixture of male insect pool + *L. infantum chagasi* promastigotes). The bottom part of the figure shows the dot hybridization result using a biotinylated probe specific for *L. infantum chagasi*, aligned with the top photograph. Following hybridization it was evidenced a second *Lu. cruzi* group (lane 8) as being infected by *L. infantum chagasi*.

the hybridization step (a 120 bp fragment visualized on ethidium bromide-stained agarose gel), confirming an adequate sensitivity of our PCR approach (Fig. 1).

In the studied locality both *Lu. cruzi* and *Lu. forattinii* are dominant species with small seasonal variation and can be captured inside houses and peri-domiciliary areas (Galati et al., 1997). Previous investigation regarding *Lu. cruzi* natural infection in Corumbá has already incriminate this species as a putative vector of VL in the region (Santos et al., 1998); from a total of 3575 females dissected, 14 were found to be infected with *Leishmania* promastigotes (0.39%). From this study the infection index for *Lu. cruzi*, estimated by the described PCR-based methodology, was 3.8 times greater than the one reported by Santos et al. (1998). Furthermore, flagellate infection in *Lu. forattinii* from the same area has been observed (Brazil et al., 2002). These evidences combined with our results indicate the importance of both phlebotomine species in the epidemiological cycle of VL in this region of Brazil, and support the potential role of *Lu. cruzi* and *Lu. forattinii* in the transmission of *L. infantum chagasi*.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (476380/2004-9) and FAPERJ. Daniela Pita-Pereira is a fellow PhD student from FIOCRUZ/CAPES; Dr. Constança Britto is a fellow of the CNPq Institution. We would like to thank Dr. J. Gordon Hamilton for the English revision.

References

- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933–1938.
- Arias, J.R., Monteiro, P.S., Zicker, F., 1996. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 145–146.
- Arruda, W., Costa, F.C., Nahas, S., Rosenfeld, G., 1949. Leishmaniose visceral americana. *Bras. Med.* 63, 64–65.
- Brazil, B.G., Teixeira, P.M.F., Minafra Jr., C.A., Temeljokovitch, M., Almeida, E.C., Brazil, R., 2002. Infecção natural de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Ascogregarina chagasi* (Adler & Mayrink, 1964). *Entomol. Vect.* 9, 289–293.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 4, 198–212.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137 (4), 214–221.
- Freitas, R.A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., 2002. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 53–59.
- Galati, E.A.B., Rego Jr., F.A., Nunes, V.L., Teruya, E., 1985. Fauna flebotomínica do Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyia forattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Rev. Bras. Entomol.* 29, 261–266.
- Galati, E.A.B., Nunes, V.L., Rego Jr., F.A., Oshiro, E.T., Rodrigues, M., 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 31 (4), 378–390.
- Killick-Kendrick, R., Ward, R.D., 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology* 82, 143–152.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 811–827.
- Lins, R.M., Oliveira, S.G., Souza, N.A., de Queiroz, R.G., Justiniano, S.C., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the *cacophony* IVS6 region in sand flies. *Insect Mol. Biol.* 11, 117–122.
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Gonçalves, M., Reis, M.G., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-Netto, M., Barral, A., 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 185–188.
- Nascimento, J.C., Paiva, B.R., Malafrente, R.S., Fernandes, W.D., Galati, E.A.B., 2007. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 49 (2), 119–122.
- Oliveira, A.G., Galati, E.A.B., Oliveira, O., Oliveira, G.R., Espindola, I.A.C., Dorval, M.E.C., Brazil, R.P., 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 869–874.
- Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M., Fernandes, O., Degrave, W., 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 19–20.
- Perez, J.E., Ogasuku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., Nieto, E., Arevalo, J., Guerra, H., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88 (2), 161–164.
- Perez, J.E., Veland, N., Espinosa, D., Torres, K., Ogasuku, E., Llanos-Cuentas, A., Gamboa, D., Arevalo, J., 2007. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (5), 655–658.
- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., Barbosa, A.F., Britto, C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905–913.
- Ryan, L., Brazil, R.P., 1984. *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of São Luis, Maranhão State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 383–384.
- Santos, S.O., Arias, J.R., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.A., Malacco, M.A.F., 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 12, 315–317.

- Santos, S.O., Arias, J.R., Hoffmann, M.P., Furlan, M.B., Ferreira, W.F., Pereira, C., Ferreira, L., 2003. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36 (5), 633–634.
- Silva, O.S., Grunewald, J., 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 579–582.
- Sudia, W.A., Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap: an improved model. Mosq. News 22, 126–129.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. Am. Entomol. Inst. 54, 1–881.

Short Report: First Report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay

Daniela Pita-Pereira, Getúlio D. Souza, Adriana Zwetsch, Carlos Roberto Alves, Constança Britto, and Elizabeth F. Rangel*

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Seção de Reservatórios e Vetores, Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central de Pública do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul; Núcleo de Vigilância de Roedores e Vetores, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre; Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract. To identify *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* naturally infected by *Leishmania* a multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used for the analysis of 450 specimens (270 females, 180 males) collected in an endemic periurban area of cutaneous leishmaniasis in Porto Alegre, Brazil. Insects were grouped into pools of 10 and positive results were achieved in 3/27 *Lu. (N.) neivai* female pools. Infection by *L. (Viannia) braziliensis* was confirmed after hybridizing PCR products with a subgenus-specific biotinylated probe. Considering the detection of three positive pools with at least one infected insect in each, an infection rate of 1.1% was estimated. Our results associated with epidemiologic data suggest a potential ability of *Lu. (N.) neivai* in transmitting *L. braziliensis* in Porto Alegre, where the first notifications of autochthonous cutaneous leishmaniasis in humans occurred in 2002, with an increase in the number of cases in recent years possibly as a consequence of deforestation and agricultural activities in the area.

In Brazil, from 2003 to 2007 the Ministry of Health recorded 181,117 human cases of American cutaneous leishmaniasis (ACL) (Alves W, unpublished data). It has been reported that an increase of ACL incidence in all Brazilian states with dissemination of the disease to the periurban areas of some state capitals, such as Manaus, Rio de Janeiro, and Belo Horizonte, thus constituting a serious health problem.^{1,2}

There are few studies directed to the sand fly fauna in Rio Grande do Sul State,^{3,4} mainly because of the inexistence of reports on autochthonous ACL cases in the last decades. More recently, in accordance with the Secretariat of Health of Rio Grande do Sul, the epidemiologic situation has changed. From 2002 to 2008, 20 confirmed autochthonous human cases resulting from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* were reported in the periphery of the city of Porto Alegre, in areas of residual vegetation close to creeks. The region presents rural zone characteristics, such as animal husbandry and agricultural activities in the proximity to residences. In previous entomologic studies, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Pinto) was the most frequent species found in the area and was considered a potential ACL vector.⁵

In the present study, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay associated to non-isotopic hybridization was used to evaluate the occurrence of *Lu. (N.) neivai* naturally infected by *Leishmania* parasites in an urban area of tourism activity located in Porto Alegre, where human ACL cases were recently described. Sand flies were collected monthly from October 2006 to May 2007 with Centers for Disease Control and Prevention (CDC) light traps in 10 monitoring stations distributed inside houses, in the peridomicile close to domestic animal shelters and in the forest. A sample constituted of 450 *Lu. (N.) neivai* phlebotomines (270 females, 180 males) was

sent to the laboratory for PCR examination after taxonomic identification according to Young and Duncan⁶ for genus and subgenus, and Marcondes⁷ and Andrade-Filho and others⁸ for the species level taking into account the morphologic characteristics of males and females. The insects were grouped into pools of 10 specimens and submitted to molecular analysis for *Leishmania* infection. The multiplex PCR^{9,10} was designed to simultaneously amplify the cacophony gene IVS6 region in sand flies of the neotropical genus *Lutzomyia* (as an internal control for the polymerase enzyme activity), and the conserved kinetoplast DNA minicircle region from *Leishmania* spp. The amplified products were further submitted to dot blot hybridization using a *L. (Viannia)*-specific biotinylated probe.⁹

The PCR assay showed positive results in 3 out of 27 female pools analyzed, and hybridization confirmed the infection with parasites from the subgenus *Viannia* (Figure 1). Considering the occurrence of at least one infected insect in each pool of 10 phlebotomines, we found that the minimal infection rate for *Lu. (N.) neivai* was 1.11%. The PCR approach was highly sensitive and able to reveal on agarose gel, a 120 bp fragment from *Leishmania* kDNA minicircles in all three positive sand fly pools before the hybridization step. All samples analyzed yielded a 220 bp amplified product corresponding to a constitutive gene (cacophony) from *Lutzomyia* spp., thus confirming the integrity of the insect DNA preparations and the absence of eventual PCR inhibitors (Figure 1).

In Brazil, ACL resulting from *L. (V.) braziliensis* has been reported in all states and involves a diversity of sand fly species, such as *Lu. (Psychodopygus) wellcomei* (Fraiha, Shaw, & Lainson, 1971); *Lu. (P.) complexa* (Mangabeira, 1941); *Lu. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *Lu. Migonei* (França, 1920), and *Lu. (N.) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), based on evidences regarding their anthropophily, natural infection by *Leishmania* parasites, and spatial distribution in accordance with human cases transmission sites.¹¹

Marcondes and others¹² discussed the epidemiologic role of *Lu. (N.) neivai* in the transmission of *L. (V.) braziliensis* in

* Address correspondence to Elizabeth Rangel, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Carlos Chagas, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: elizabethrangel@fiocruz.br

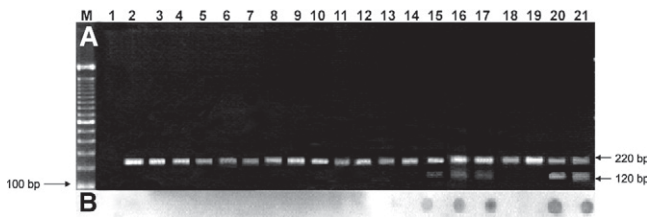


FIGURE 1. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) followed by hybridization for the diagnosis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in *Lutzomyia neivai* collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil. The phlebotomines were grouped into pools of 10 female specimens and PCR was performed with total DNA extracted from these pools. **A**, Ethidium bromide-stained 2% agarose gel revealing the 220 bp product from cacophony gene amplification (*Lutzomyia* genus) and the 120 bp fragment corresponding to the conserved kinetoplast minicircle region from *Leishmania* spp. **M**, molecular weight marker (100 bp DNA ladder). Lane 1, amplification reaction without added DNA (PCR negative control); lanes 2–5, negative controls for the DNA extraction step (male insect pools); lanes 6–19, female sand fly pools (lanes 15–17, *Lu. neivai* positive pools); lanes 20 and 21, PCR positive controls (DNA extracted from a mixture of male insect pool containing *L. (V.) braziliensis* promastigotes). **B**, Dot hybridization using a biotinylated probe specific for parasites from the *Viannia* subgenus.

southeast and south of Brazil, in cold and dry areas. Afterwards, some aspects concerning the vectorial competence of this sand fly species were studied in Argentina¹³ in a transmission area of ACL, where it was reported a high *Lu. (N.) neivai* density associated with human cases in the domiciliary environment, and in the secondary and primary forest. Studies on *Lu. (N.) neivai* in southeastern Brazil brought more insights about the biologic characteristics of this species and suggested that dispersion from the forest to peridomicile areas could be important for the transmission of ACL inside houses.¹⁴ In 2006, Córdoba-Lanús and others¹⁵ reported for the first time natural infection of *Lu. (N.) neivai* with *Leishmania* from an area in Argentina where *Leishmania (Viannia)* was the main circulating parasite. More recently, also in Argentina, in an area considered as hyperendemic for ACL, the transmission was associated to *Lu. (N.) neivai* in periurban vegetation and ecotone modified regions.¹⁶

Taking into account the first reports of ACL in Porto Alegre, south Brazil, studies concerning the sand fly fauna were performed. Captures carried out inside houses and in peridomicile areas, with the occurrence of human ACL cases, revealed the predominance of *Lu. (N.) neivai* (94.9%) without the identification of *Lu. (N.) intermedia* (Azevedo A and others, unpublished data). Epidemiologic data from the Secretariat of Health of Porto Alegre⁵ suggested *Lu. (N.) neivai* as the main vector of ACL, because of its anthropophilic characteristic and spatial and seasonal abundance in anthropic environments. This information associated with the evidence of natural infection by *Leishmania* indicate the importance of *Lu. (N.) neivai* in the epidemiologic cycle of ACL in Porto Alegre, and suggests this species as another *L. (V.) braziliensis* vector in the southeast and south regions of Brazil.

Received August 22, 2008. Accepted for publication December 10, 2008.

Acknowledgments: We thank J. A. Ferreira, A. N. Martínez, and B. S. Pereira for the English revision.

Financial support: This investigation was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq, Brasil (476380/2004-9).

Disclosure: Daniela Pita-Pereira is a fellow PhD student from FIOCRUZ/CAPES, Carlos R. Alves, Constança Britto, and Elizabeth F. Rangel are fellows of the CNPq Institution, and Adriana Zwetsch is a fellow of the FAPERJ Institution.

Authors' addresses: Daniela Pita-Pereira, Carlos R. Alves, and Constança Britto, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Leônidas Deane sala 209, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Getúlio D. Souza, Seção de Reservatórios e Vetores, Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central de Pública do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 5400, Bairro Jardim Botânico, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil; Núcleo de Vigilância de Roedores e Vetores, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, Avenida Padre Cacique 372, Bairro Menino Deus, 90810-240, Porto Alegre, RS, Brasil. Adriana Zwetsch and Elizabeth F. Rangel, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Carlos Chagas, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Tel: +55-21-2590-9590, Fax: +55-21-2560-7011, E-mail: elizabethrangel@fiocruz.br.

Reprint requests: Elizabeth Rangel, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Carlos Chagas, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

REFERENCES

- Marzochi MCA, Marzochi KB, 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10: 359–375 (in Portuguese).
- Kawa H, Sabroza PC, 2002. Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica* 18: 853–865 (in Portuguese).
- Dias ES, Falcão AL, Silva JE, 1997. Notes on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in the State of Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 329–332.
- Silva OS, Grunewald J, 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 579–582.
- Gonçalves BRD, 2003. Identificação da fauna de flebotomíneos em função de casos autóctones de LTA. *Boletim Epidemiológico, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre* 21: 5 (in Portuguese).
- Young DG, Duncan MA, 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 54: 1–881.
- Marcondes CB, 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.
- Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL, 2003. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1059–1065.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho A, Barbosa A, Britto C, 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 905–913.
- Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C, 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 107: 66–69.
- Rangel EF, Lainson R, 2003. Ecologia das leishmanioses. Rangel EF, Lainson R, eds. *Flebotomíneos do Brasil*. (First edition). Fundação Oswaldo Cruz: Fiocruz, pp. 291–337 (in Portuguese).

12. Marcondes CB, Day JC, Ready PD, 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 725–726.
13. Salomón OD, Wilson ML, Munstermann LE, Travi BL, 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.
14. Casanova C, Costa AI, Natal D, 2005. Dispersal pattern of sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 719–724.
15. Córdoba-Lanús E, De Grosso ML, Piñero JE, Valladares B, Salomón OD, 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98: 1–5.
16. Salomón OD, Quintana MG, Zaidenberg M, 2008. Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 282–287.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Short communication

Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil

Maria Rosimery de Carvalho^{a,c}, Helio França Valença^a, Fernando José da Silva^a, Daniela de Pita-Pereira^b, Thaís de Araújo Pereira^b, Constança Britto^b, Reginaldo Peçanha Brazil^{c,*}, Sinval Brandão Filho^a

^a Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE 50670-420, Brazil

^b Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2010

Received in revised form 13 March 2010

Accepted 23 March 2010

Available online xxx

Keywords:

Leishmania infantum

Visceral leishmaniasis

Phlebotominae

Migonemyia migonei

Natural infection

ABSTRACT

A study of the natural infection of phlebotomine sand flies by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* was conducted in an area of visceral leishmaniasis in São Vicente Férrer, located in the northern part of the Atlantic rain forest region in the State of Pernambuco, Brazil. In a previous study, *Migonemyia migonei* have been found predominantly in peridomestic and houses in this endemic area. The analysis of *M. migonei*, collected by CDC light trap, by multiplex PCR assay coupled to non-isotopic hybridization showed that 2 females out of 50 were infected by *L. infantum*. This is the first finding of natural infection of *M. migonei* by *L. infantum* suggesting that *M. migonei* may be the vector of *L. infantum* in areas of visceral leishmaniasis where *Lutzomyia longipalpis*, the usual vector, is absent.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a zoonosis of domestic and silvatic canids and endemic in several Latin American countries. The disease has been observed in the northeast of Brazil since the 1930s (Deane and Deane, 1962). In the past three decades the re-emergence and urbanization of AVL in Brazil has led the disease to become a major public health problem in the country (Arias et al., 1996; Lainson and Rangel, 2005; Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2006a). The etiological agent is *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Nicolle and *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) acts as primary vector (Deane and Deane, 1962; Lainson and Rangel, 2005) in large part of Brazil, except for some areas in Mato Grosso do Sul where *Lutzomyia cruzi* is the incriminated vector (Santos et al., 1998; Pita-Pereira et al., 2008). In the State of Pernambuco, AVL was reported as early as 1934 with sporadic human cases (Arruda et al., 1949). Since then, there has been an expansion of the disease to new areas and actually it can be considered as endemic in different regions of the state (Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2006b). Most cases of

AVL are from the backlands (Sertão), however since 1999, human cases have been reported in São Vicente Férrer located in the northern region of Zona da Mata. In this region cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *brasilensis* is the predominant form of leishmaniasis (Brandão-Filho et al., 1999, 2003).

In a previous entomological study in São Vicente Férrer, *L. longipalpis* was not found, but the predominance of *Migonemyia migonei* led to the suspicion of this species in the transmission of AVL in the domestic zoonotic cycle (Carvalho et al., 2007).

The use of PCR for the detection of *Leishmania* DNA in wild sand flies is a useful technique to identify putative leishmaniasis vectors in different geographic areas (Barker, 1989; Silva and Grunewald, 1999; Miranda et al., 2002; Pita-Pereira et al., 2005, 2008; Perez et al., 2007). The main advantages of molecular methods are their sensitivity and specificity, independent of the number, stage and localization of the parasite in the insect midgut (Perez et al., 1994).

In the present study, natural infection of sand flies with *Leishmania* species was surveyed in an area of São Vicente Férrer where six autochthonous cases of human visceral leishmaniasis were reported during 1999–2000 and canine visceral leishmaniasis have been recently identified.

Sand flies were captured with CDC light traps (Sudia and Chamberlain, 1962) in a peridomestic area of the locality of Mundo Novo, municipality of São Vicente Férrer in the northern Zona da

* Corresponding author at: Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pavilhão Leônidas Deane – sala 213, Avenida Brasil 4365, CP 926, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
Tel.: +55 21 3865 8134; fax: +55 21 2590 3495.

E-mail address: rpbrasil@ioc.fiocruz.br (R.P. Brazil).

Mata region (07°35'28"S, 35°29'29"W) during three following days in June 2009. Captures were performed from 6:00 p.m. to 6:00 a.m. by using two traps 1 m above the ground and 20 m apart. The captured specimens were transported alive to the laboratory where part of them was dissected in saline solution and the guts investigated for natural *Leishmania* infection, while another group was kept dry for further PCR analysis. Species nomenclature follows Galati (2003) and abbreviations of sandflies names were in accordance with Marcondes (2007). In this particular ecotope, on basis of morphologic characters, the most prevalent species were *M. migonei* (90%) followed by *Evandromyia evandroi* and *Psychodopygus complexus*.

For DNA extraction and multiplex PCR-dot blot hybridization, each individual from a group of 50 females of *M. migonei* was conditioned in 1.5 mL tubes containing 100 µL of TE buffer (pH 8.0) and stored at -20°C until DNA extraction. DNA was extracted as previously described (Pita-Pereira et al., 2005) and rigorous procedures were assumed in order to control any contamination. For the multiplex PCR assay, two primer pairs were used. The primers [5'-GGCCACTATATTACCAACCCC-3' and 5'-GGGTAGGGCGTCTCGAA-3'] were employed to amplify the conserved region of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania* spp. (Passos et al., 1996). The second primer set amplifies the cacophony gene IVS6 region in sand flies of the Neotropical genus *Lutzomyia*: 5Llac [5'-GTGCCGAACATAATGTTAG-3'] and 3Llac [5'-CCACGAACAAGTTCA ACATC-3'] (Lins et al., 2002). The reactions were carried out in a final volume of 100 µL containing 1 × Taq polymerase buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP (Invitrogen), 0.2 µM of each primer, 1.25 U Taq.

Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 µL DNA sample. The mixture was incubated in a PerkinElmer thermocycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) at 94°C for 12 min for enzyme activation (hot-start PCR), followed by 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C, and a final extension step for 10 min at 72°C. Ten microlitres of the amplification product were resolved on 2% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet transillumination following ethidium bromide staining. The amplified products were also analyzed by dot blot hybridization, as previously described by Pita-Pereira et al. (2008), by using a *L. infantum* specific biotinylated probe [5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'] designed to an internal sequence of the kDNA minicircle conserved region (Francino et al., 2006).

A total of 380 *M. migonei* specimens (156 males and 224 females) were collected and a group of 50 females and 10 males were individually analyzed. The males were used as negative controls for the DNA extraction step, as a way to verify for eventual contamination in the PCR analysis (Pita-Pereira et al., 2005). All individuals, males and females, showed a 220 bp band specific for the *Phlebotominae* cacophony gene and thus indicating the absence of PCR inhibitors. Two positive females out of 50 (4%) were confirmed as infected by *L. infantum* when the PCR products were subjected to hybridization with the specific probe.

In the State of Pernambuco, visceral leishmaniasis has been expanded in the last 15 years even to the northern Zona da Mata region, where no autochthonous cases had been previously recorded and cutaneous leishmaniasis, caused by *L. (V.) braziliensis*, is prevalent (Brandão-Filho et al., 1999, 2003; Carvalho et al., 2007). Since the first detection of human and canine visceral leishmaniasis in this region, several tentative to find the usual vector (*L. longipalpis*) have failed (Carvalho et al., 2007). In some Latin America countries, including Brazil, different sand fly species are already incriminated as vectors of *L. infantum*, such as *L. pseudolongipalpis* (Felicangeli et al., 2006), *Lutzomyia evansi* (Travi et al., 1990) and *L. cruzi* (Santos et al., 1998; Pita-Pereira et al., 2008).

Natural infections by *L. (V.) braziliensis* detected by PCR were reported in *M. migonei* in a cutaneous leishmaniasis area in Rio de Janeiro (Pita-Pereira et al., 2005) and this species is already incriminated as vector of cutaneous leishmaniasis in other regions (Queiroz et al., 1994).

In two previous AVL foci in Rio de Janeiro, Brazil and Santiago del Estero, Argentina, *M. migonei* has been proposed as a potential vector of *L. infantum* (Souza et al., 2003; Salomon et al., 2010). Our findings confirms the previous evidence of *M. migonei* as the vector of this parasite in the northern of the Atlantic rainforest region in the State of Pernambuco, mainly due to the abundance and predominance of this phlebotomine species in houses and animal shelters in the peridomicile environment (Carvalho et al., 2007). Furthermore, this species is shown to be anthropophilic and bites also domestic animals such dog and equines in several regions of Brazil (Rangel and Lainson, 2009). The finding of *M. migonei* naturally infected with *L. infantum* strongly suggests its putative role in transmitting this parasite species in Pernambuco, Brazil.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grant 410481/2006-8), FAPERJ and FIOCRUZ. Sival Brandão Filho and Constança Britto are fellows researcher of CNPq. Our special thanks to Michelle C. Q. Pontes for technical help.

References

- Arias, J.R., Monteiro, P.S., Zicker, F., 1996. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 145-146.
- Arruda, W., Costa, F.C., Nahas, S., Rosenfeld, G., 1949. Leishmaniose Visceral Americana. *Brasil-Med.* 63, 64-65.
- Barker, D.C., 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99, 125-146.
- Brandão-Filho, S.P., Campbel-Lendrum, D., Brito, M.E.F., Shaw, J.J., Davies, C.R., 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 488-494.
- Brandão-Filho, S.P., Brito, M.E.F., Carvalho, F.G., Ishiawa, E., Cupolilo, E., Floeterwintter, L.M., Shaw, J.J., 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 291-296.
- Carvalho, M.R., Lima, B.S., Marinho, J., Ferreira, J., Silva, F.J., Valença, H.F., Almeida, F.A., Silva, A.L., Brandão-Filho, S.P., 2007. Phlebotomine sandflies species from American visceral leishmaniasis in the North Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. *Cad. Saúde Públ.* 23, 1227-1232.
- Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2006a. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 48, 151-156.
- Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2006b. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 352-356.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 4, 198-212.
- Felicangeli, M.D., Delgado, O., Suarez, B., Bravo, A., 2006. Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela. *Trop. Med. Int. Health* 11, 1785-1791.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214-221.
- Galati, E.A.B., 2003. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 23-51.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 811-827.
- Lins, R.M., Oliveira, S.G., Souza, N.A., de Queiroz, R.G., Justiniano, S.C., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. *Insect Mol. Biol.* 11, 117-122.
- Marcondes, C.B., 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) of the world. *Entomol. News* 118, 351-356.
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Gonçalves, M., Reis, M.G., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-Netto, M., Barral, A., 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 185-188.

- 204 Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M., Fernandes, O., Degraeve, W., 1996. Natural
205 infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the
206 metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst.
207 Oswaldo Cruz 91, 19–20.
- 208 Perez, J.E., Ogasuku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., Nieto, E., Arevalo, J.,
209 Guerra, H., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans.
210 R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 161–164.
- 211 Perez, J.E., Veland, N., Espinosa, D., Torres, K., Ogasuku, E., Llanos-Cuentas,
212 A., Gamboa, D., Arevalo, J., 2007. Isolation and molecular identification of
213 *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis*
214 (Diptera:Psychodidae) in the Peruvian Andes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102,
215 655–658.
- 216 Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., Barbosa, A.F., Britto,
217 C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia*
218 *migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed
219 by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. Trans. R. Soc. Trop. Med.
220 Hyg. 99, 905–913.
- 221 Pita-Pereira, D., Cardoso, M.A.B., Alves, C.R., Brazil, R.P., Britto, C., 2008.
222 Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii*
223 (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) by *Leishmania infantum* in an endemic
224 area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. Acta Trop.
225 107, 66–69.
- 226 Queiroz, R.G., Vasconcelos, I.A., Vasconcelos, A.W., Pessoa, F.A., Souza, R.N., David,
J.R., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrim-
ination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) as a vector of *Leishmania*
braziliensis in Baturité municipality. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 693–698.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous
leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem.
Inst. Oswaldo Cruz 104, 937–954.
- Salomon, O.D., Quintana, M.G., Bezzi, G., Morán, M.L., Betbeder, E., Valdéz, D.V., 2010.
Lutzomyia migonei as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda,
Argentina. Acta Trop. 113, 84–87.
- Santos, S.O., Arias, J.R., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.A., Malacco, M.A.F.,
1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leish-
maniasis. Med. Vet. Entomol. 12, 315–317.
- Silva, O.S., Grunewald, J., 1999. Contribution to the sand fly fauna
(Diptera:Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania*
(*Viannia*) infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 579–582.
- Souza, M.B., Marzochi, M.C.A., Carvalho, R.W., Ribeiro, P.C., Pontes, C.S., Caetano,
J.M., Meira, A.M., 2003. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de
ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cad. Saúde
Públ. 19, 109–118.
- Sudia, W.A., Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap: an improved
model. Mosq. News 22, 126–129.
- Travi, B.L., Vélez, I.D., Brutus, L., Segura, I., Jaramillo, C., Montoya, J., 1990. *Lutzomyia*
evansi, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral
leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 676–677.

Research Article

Canine Leishmaniasis in Brazil: Serological Follow-Up of a Dog Population in an Endemic Area of American Visceral Leishmaniasis

Alba Valéria Machado da Silva,¹ Adelzon Assis de Paula,² Daniela de Pita Pereira,³
Reginaldo Peçanha Brazil,⁴ and João Carlos Araujo Carreira¹

¹ Departamento de Protozoologia, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil

² Centro de Ciências de Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, CEP 21941-901, Brazil

³ Laboratório de Bioquímica Molecular de Doenças Endêmicas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil

⁴ Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil

Correspondence should be addressed to João Carlos Araujo Carreira, carreira@ioc.fiocruz.br

Received 14 July 2009; Accepted 16 October 2009

Recommended by David S. Lindsay

We performed a serological, clinical, and parasitological follow-up of a dog population in an endemic area of American Visceral Leishmaniasis estimated by indirect immunofluorescent assay (IFA) and western blot (WB). After twelve months, the results obtained from IFA demonstrated that 50% were seropositive and two serological profiles were observed: the first one ranging from 1/40 to 1/80 and the second $\geq 1/160$. By WB, it was observed that the same percentage and sera from positive dogs presented the recognition of the peptides of 29 and 32 kDa up to 8 months before IFA serum conversion. Among the positive dogs, all the sera from symptomatic ones with tissue parasitism recognized the peptide of 68.5 kDa. Our results suggest the need of modifications in the control measures regarding the elimination of the dogs. They also corroborate the high sensitivity and specificity of western blot in the diagnosis of canine leishmaniasis, suggesting the possibility of its association with IFA.

Copyright © 2009 Alba Valéria Machado da Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Leishmaniasis, a disease caused by several species of a protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), is endemic in 88 countries [1] with epidemiological peculiarities according to factors such as human activity, parasite subpopulation, and wild and domestic sand fly fauna composition, among others. In the American continent, the disease, named American Visceral Leishmaniasis, occurs in the tropical and subtropical regions. In Brazil, besides being a rural zoonosis, Visceral Leishmaniasis is becoming a peri-urban and even urban zoonosis [2].

Both domestic and wild canids are described as the most important reservoirs of *Leishmania infantum chagasi* [3, 4]. Canine leishmaniasis is a chronic infection that should be considered viscerocutaneous and present a more severe prognosis than human disease. Nevertheless, like in humans,

dogs can display an asymptomatic form of the infection or may even evolve to resolution [5]. Symptoms of the overt form of the disease are nonspecific and include fever, weight loss, renal failure, lethargy, onychogryphosis, generalized lymphadenomegaly, skin, and ocular lesions [6].

In Brazil, the leishmaniasis control measures include the elimination of seropositive dogs based on indirect immunofluorescent assay (IFA). The culling of dogs based only on serological titers $\geq 1/40$ may result in an undesirable outcome, because like in humans, dogs may control infection by *L. infantum* depending on the competence of their cellular immune response. Elimination of seropositive dogs that already controlled the infection will probably result in replacement by another susceptible animal, a new potential source of infection for men [7].

In the Old World, several studies have suggested the western blot technique as a very sensitive and precocious

serological tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis [8, 9]. Differently, in the New World there are scarce reports regarding the use of that technique, and few studies accomplished in Brazil corroborate the western blot as a reliable diagnostic assay. De Paula et al. [10] have demonstrated that the peptides of 29 and 32 kDa were recognized precociously by *Leishmania (i.) chagasi* parasitized dogs.

In the present study we reappraise the issue in dogs from an endemic peri-urban area in Rio de Janeiro state, where eleven human cases of visceral leishmaniasis have been detected, 25% of the cats [11] and 29% of the opossums [12] were seropositives, and *Lutzomyia longipalpis* represented 19% of the total sand fly population.

The purpose of this study was to perform a serological, clinical, and parasitological follow-up of naturally infected dogs in an endemic area of AVL, to analyze the kinetics of the infections by comparing the IFA and WB results and attempting to identify potential prognostic markers.

2. Materials and Methods

2.1. The Studied Area. Barra de Guaratiba is a strip of land localized between the Atlantic Ocean and the mountains of Pedra Branca, a massif belonging to Serra do Mar in Rio de Janeiro State. The climate is tropical, with an annual average temperature of 27.5°C and rainfall of 1400 mm. Secondary Atlantic Forest altered by anthropic action covers the mountain slopes.

The measures implemented by control program of AVL in this area included culling of serumpositive dogs (IFA on blood eluate) and spraying houses and annexes to control the adult forms of the vectors.

2.2. Dog Populations. At the beginning of the study there were 197 dogs. All the animals were monitored through visits to their home places from an endemic area in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil and tested by an Immunofluorescence and western blot assays for the presence of specific antibodies. A great number of dogs were lost during the follow-up, because of culling by the control program, death by natural causes, and the relocation of the animals in other areas by the owners. From this initial sample, 60 remaining dogs were followed up every two months, during one year, as follows: months 2, 4, 6, 8, 10, and 12 correspond, respectively, to February, April, June, August, October, and December. Despite the control program, all the serumpositive dogs among those 60 remained in the area during the follow-up.

Dog population was composed of domestic dogs with little or no access to veterinary care. This work was carried out in accordance with the ethical principles of animal experimentation and it was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

The clinical evaluation that included palpation of lymph nodes, and an appreciation of the general health status of the animal, was carried out at the time of blood collection.

Blood was collected by puncture of the cephalic vein. Blood samples were allowed to clot and serum was separated by centrifugation (10 min/30.000 ×g) and stored at -20°C until use.

None of the animals involved in our study were vaccinated.

2.3. IFA. The assay was carried out according to the procedures previously described by Camargo [13]. Serum dilutions ranging from 1 : 10 to 1 : 2560 were tested and as cut-off of the positive reaction titers a dilution of 1 : 40 was adopted, established by the Brazilian Ministry of Health.

2.4. Western Blot. Western blot analysis was carried out according to Aisa et al. [8]. Briefly, antigen was obtained from the protease inhibitor (Phenanthroline 10 mM, Phenylmethanesulfonyl fluoride 0.1 M, Iodoacetamide 0.2 M) containing soluble phase (39.191 ×g/30 minutes) of lysed (mini-bomb cell disruption chamber) *L. chagasi* strain L-579 promastigotes, separated on 12.5% polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose paper (NCP). Sera diluted 1/50 were incubated with a strip of NCP overnight at 4°C. Bound immunoglobulins were detected by incubation with rabbit antidog IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma, St Louis, MO) and developed with H₂O₂ (0,06% v/v) and diaminobenzidine (25% w/v, Sigma, St Louis, MO).

2.5. Parasitological Follow-Up and Necropsy of the Dogs. Parasitological follow-up: enlarged popliteal lymph nodes observed in four of the 60 dogs were punctured by using Vacutainer tubes containing NNN medium, with a Schneider's complete medium (Sigma, St Louis, MO) overlay that included 20% of fetal calf serum. The tubes were kept at 27°C and examined every five days during two months.

Necropsy: four of the 60 dogs were killed with an overdose of Thiopental sodium (10–25 mg/kg, IV) and potassium chloride (100 mg/kg, IV). At necropsy, Giemsa-stained imprints and smears were made of healthy ear and abdominal skin, liver, spleen, lymph nodes, and ascitic liquid and examined for the presence of amastigotes.

2.6. PCR. For DNA isolation and PCR analysis, dogs' spleen samples were mixed with a solution of Guanidine-EDTA in a proportion of 1 : 1 and after 24 hours the mixture was boiled for 1 minute and kept at 4°C up to DNA extraction. Total DNA was also obtained from cultured *L. (L.) chagasi* promastigotes (MHOM/BR/1974/PP75) used as a positive control. PCR was carried out according to Passos et al. [14].

2.7. Dot Blot Analysis to Detect *Leishmania chagasi* Infection. The amplified products were also analyzed by dot blot hybridization as described by Francino et al. [15].

3. Results

3.1. IFA. In the beginning of the follow-up, 41.7% (25/60) of the dogs were seropositive, they were asymptomatic, and serological titers ranged from 1 : 40 to 1 : 640 (Table 1), in

TABLE 1: Serological and clinical follow-up of *Leishmania (i.) chagasi* infection in dogs. The correlation between serological titers, western blot, and symptoms in dogs, every two months during one year of follow-up. All sera from positive dogs recognized peptide of 29 and 32 kDa and sera from symptomatic dogs recognized peptide of 68.5 kDa. (-): negatives; (Prof): profile; (IFA): indirect immunofluorescent assay; (WB): western blot; (S): symptoms; (*) dogs that seroconverted; (†) dogs died; (‡) dogs killed.

Dogs n°	Month 2			Month 4			Month 6			Month 8			Month 10			Month 12			
	IFA	WB 68.5	S	IFA	WB 68.5	S	IFA	WB 68.5	S	IFA	WB 68.5	S	IFA	WB 68.5	S	IFA	WB 68.5	S	
1-13	40	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-	
Prof 1	14-15	80	-	-	80	-	-	80	-	-	80	-	-	80	-	-	80	-	-
	16*	-	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-	40	-	-
Total	16																		
	17*	-	-	-	-	-	40	-	-	40	-	-	160	-	-	640	-	-	
	18*	-	+	-	160	+	-	1280	+	-	1280‡	+	+						
	19*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160	-	-	
	20*	-	-	-	-	-	40	-	-	160	-	-	160	-	-	320	-	-	
	21	40	+	-	80	+	-	40	+	-	160	+	-	160	+	-	320‡	+	+
	22	40	-	-	160	-	-	160	-	-	640	-	-	640	-	-	640	-	-
Prof 2	23	40	-	-	160	-	-	1280	-	-	640	-	-	640	-	-	640	-	-
	24	80	-	-	80	-	-	80	-	-	640	-	-	320	-	-	640	-	-
	25	80	-	-	80	-	-	160	-	-	320	-	-	320	-	-	640	-	-
	26	80	+	-	160	+	-	640	+	-	1280	+	+	1280‡	+	+			
	27	160	+	-	320	+	-	160	+	-	320	+	+	320†	+	+			
	28	160	+	-	80	+	-	160	+	-	320	+	-	1280‡	+	+			
	29	320†	-	-															
	30	640	-	-	640	-	-	1280	-	-	1280	-	-	1280	-	-	640	-	-
Total	14																		

spite of the surveillance performed by the Brazilian Ministry of Health in the study area.

One year later, at the end of the study, 50% (30/60) of the animals were seropositive, so, the incidence of seroconversion was 8.3% (5/60) during the follow-up. The seroconversions were observed, respectively, on month 4 in 2 dogs, month 6 in 2 dogs, and month 12 in 1 dog (Table 1).

After twelve months two serological profiles were observed: the first one, ranging from 1/40 to 1/80, composed of 16 animals that stayed with low serological titers during the whole year and they did not present any symptoms; the second, with serological titers $\geq 1/160$, composed of 14 animals, with a tendency to present higher serological titers and some dogs showing symptoms and tissular parasitism.

3.2. Clinical and Infection Status of Dogs. After one year, five of the 14 dogs belonging profile 2 displayed symptoms that appeared between 8 and 12 months and all of them had IFA titers $\geq 1/320$. In all the five dogs were observed apathy and weight loss. Hepatosplenomegaly was observed in 2 animals, discrete lymphadenopathy in 2 animals, onychogryphosis in 1 animal, and ascitis in 1 animal (Table 2). One of the dogs died and the others were euthanased and necropsied.

3.3. Western Blot Analyses. In the results obtained by western blot during the follow-up, the profile of antigenic recognition did not show any difference, except for the dogs that seroconverted that presented an increase of the number of bands and the intensity of its recognition.

It was observed a high seroprevalence (50%) with a strong and homogeneous pattern of antigenic recognition. The recognized polypeptide fractions were in the range of 4 to 220 kDa and all animals with confirmed infection systematically recognized peptide bands of 29 and 32 kDa (Figure 1). Only the sera from the 5 symptomatic dogs recognized the band of 68.5 besides those of 29 and 32 (Figures 1 and 2) and all those animals presented serological titers $\geq 1/320$.

Sera from noninfected dogs from endemic and nonendemic areas displayed equivalent recognition patterns that included weak recognition of antigens of 37, 42.5, and 71.5 kDa. The thirty negative sera weakly recognized a maximum of five peptide fractions, not including the peptides 29, 32, or 68.5 kDa.

3.4. Parasitological Evaluation. In all the four animals that were necropsied, amastigotes were found in liver, spleen, skin, and lymph node imprints (Table 2).

In one of those animals, it was observed ascitis and from this dog, several liters of ascitic liquid were punctured intensely parasitized. The serological titers from the four animals that were necropsied were, respectively, 1/320 in one animal and 1/1280 in 3 animals. Two dogs with serological of 1/1280 were intensely parasitized.

Puncture of enlarged poplyteal lymph nodes from four out of 30 seropositive dogs was all negatives in attempt to isolate *Leishmania*.

TABLE 2: Serological, clinical, and parasitological profiles of *Leishmania (i.) chagasi* infection in dogs. Description of the symptoms of the positive dogs and correlation with IFA, WB, and presence of parasites.

Dogs n°	Clinical status	IFA	WB		Presence of parasites					
			29/32	68.5	Ear skin	Abdominal skin	liver	spleen	Lymph nodes	Ascitic liquid
18	Apathy, weight loss, hepatosplenomegaly onychogryphosis	1280	+	+	++	++	++	++	++	-
21	Apathy, weight loss, lymphadenopathy	320	+	+	+	+	+	+	+	-
26	Apathy, weight loss,	1280	+	+	+	+	+	+	+	-
28	Apathy, weight loss, hepatosplenomegaly lymphadenopath, ascitis.	1280	+	+	++	++	++	++	++	++

IFA: indirect immunofluorescent assay; WB: western blot.

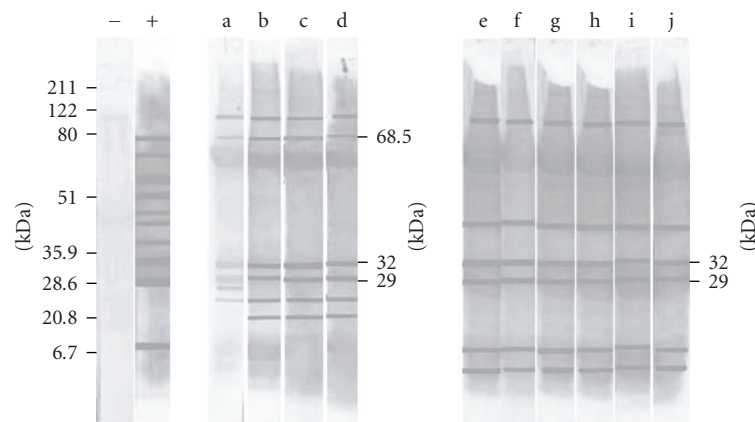


FIGURE 1: Antigenic recognition by western blot from sera of naturally infected dogs with *L.(i.) chagasi*. Lane (-): serum from serumnegative (IFA) dog. Lanes (+): serum from serumpositive (IFA 1/1280) dog. Lane a–d: serum from dog 18, that seroconverted to *Leishmania (i.) chagasi* (IFA) during follow-up. Lane a: IFA negative, western blot positive (bands 68.5, 32 and 29 kDa); b–d follow-up dog 18: IFA titers 1/1280 from month 2 of the follow-up onwards. Lane e–j: serum sample from dog 30 asymptomatic, IFA positive (1/640), and western blot positive (bands 32 and 29 kDa) at all six sample collections points.

3.5. PCR and Dot Blot Analysis to Detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* Infection. All samples studied were realized in duplicate. In the visualization of the amplification products in agarose gel of two dogs samples, both were positives, amplifying the product of 120 pb, corresponding to the conserved kDNA region of *Leishmania sp.*

After hybridization of this amplified product with an specific probe for *L. infantum*, the positive samples were confirmed as *Leishmania (i.) chagasi* and all negative samples maintained negative (Figure 3).

4. Discussion

In canine visceral leishmaniasis, low levels of antibodies production are related with low parasitemia, conversely, high antibody production has been associated with clinical disease and a best chance of parasite detection [7, 16, 17].

In the present study, we observed the occurrence of two serological profiles after one year of follow-up of a canine population by IFA. The animals of profile one, that presented

low serological titers during the whole year, probably were either in the early phases of infection or controlled it in a similar mechanism as described in *Leishmania Infantum* [7, 18]. On the other hand all animals of profile two showed an increase on serological titers, some of them reaching 1/1280, suggesting that probably these animals lost their ability in controlling the infection, presenting within a few weeks symptoms and high number of parasites.

It has been proposed as an effective control measure, the culling of infective dogs with titer of $\geq 1/40$ [19, 20]; however, some studies argue against using this measure [21, 22]. Our results suggest that in case of the adoption of control measures that include the retreat of the seropositive dogs, the cut-off (1/40) must be maintained as the standard of positivity. Nevertheless, only the animals with titers of $\geq 1/160$ that belong to profile two should be eliminated. It is likely that those animals that show high serological titers and tissular parasitism are more infective for sand flies because dog infectiousness and the proportion of sand flies infection were already suggested to be strongly correlated

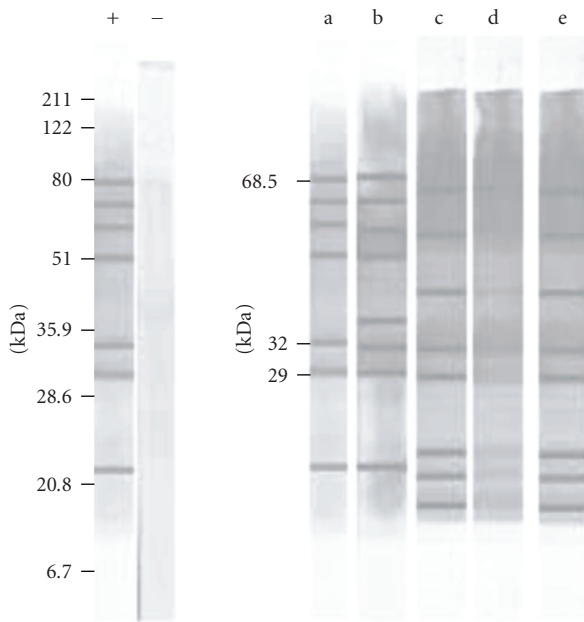


FIGURE 2: Antigenic recognition by western blot from sera of symptomatic and asymptomatic dogs with *L. (i.) chagasi*. Antigen recognition of *Leishmania (i.) chagasi* by serum from naturally infected dogs. Lane (–): serum from seronegative (IFA) dog. Lane (+): serum from seropositive (IFA 1/1280) dog. Lanes a and b: IFA seropositive symptomatic dogs. Lanes c, d, and e: IFA seropositive asymptomatic dogs.

with anti-*Leishmania* antibody levels and intensity of skin disease [4, 20, 23].

In relation to the animals belonging to profile 1, they should still be monitored, because those dogs probably may reflect different clinicoepidemiological situation, such as early phases of infection or natural resistance of the host.

In a longitudinal study performed on 43 beagle dogs exposed to three transmission seasons (2002 to 2004) of Mediterranean Leishmaniasis, the results observed by the authors corroborate with our data at least in part, because they identified as with patent infection, animals with serological titers $\geq 1 : 160$ and tissular parasitism, presenting symptoms or not. On the other hand, dogs were considered with subpatent infection, when they present titers $< 1 : 160$ without tissular detectable parasitism [24].

Moreover, culling animals that do not show signs of disease often results in owners hiding their animals, preventing them even to be examined and tested and consequently leading to the persistence of parasitized dogs.

Western blot assay has been considered as a highly specific and precocious method for the diagnosis of canine american visceral leishmaniasis because parasitic peptide fractions of 29 and 32 kDa were associated with occurrence of *Leishmania* infection in dogs [10]. Our results corroborate with those observations because the sera of all the infected dogs recognized such peptide fractions of 29 and 32 kDa up to 8 months before IFA serum conversion, although it has not implied in a prognosis for the outcome of disease.

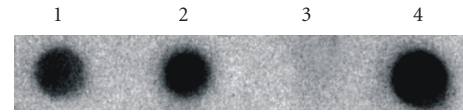


FIGURE 3: Hybridization with specific probe for *Leishmania infantum chagasi*. Amplified products from specific primers for the *Leishmania* (120 pb). (1) and (2) dogs positive samples, (3) negative sample, (4) positive *Leishmania (i.) chagasi* control. All samples studied were realized in duplicate.

The recognition of the 68.5 kDa band could be of prognostic value; indeed, only sera of the 5 symptomatic dogs reacted with this fraction while none of the sera from 25 asymptomatic dogs showed recognition (Figure 2). The same results were observed among sera of 12 symptomatic dogs in a population of 42 animals from another area not included in this study (data not shown).

According to Carrera et al. [25] in experimentally infected dogs with *L. infantum*, the recognition of some antigens by the sera of the animals with the worse clinical evolution was associated with active amastigote multiplication. We think the recognition of the 68.5 kDa peptide only by the sera of symptomatic dogs could represent a similar mechanism.

Regarding the symptoms, in our study, it was not observed any sign that could be described as characteristic of leishmaniasis, because negative dogs also displayed the same symptoms as the positive ones, with the difference that in the negative dogs the symptoms tended to revert. Weight loss was the most frequent symptom observed among both the positive and negative dogs. In none of the animals skin lesions were found and it is worthwhile to point out that all the symptomatic animals presented amastigotes in skin of the ear and abdomen. Those observations demonstrated that dogs even without skin lesions, can represent an important infection source for sand flies.

Lymph nodes culture as also observed by others authors [26, 27] showed not to be a useful diagnostic method, it was not possible to isolate the parasite from dogs even with amastigotes in ear skin, liver, and spleen imprints, probably because of culture contamination occurred in function of the inadequate field conditions.

Acknowledgments

This work received financial support from CNPq/Fiocruz—Papes IV, Faperj—APQ1 and from Instituto Oswaldo Cruz. The authors are also grateful for technical support of Marcos Antônio dos Santos Lima and Wagner Lança Passos.

References

- [1] J. Alvar, S. Yactayo, and C. Bern, “Leishmaniasis and poverty,” *Trends in Parasitology*, vol. 22, no. 12, pp. 552–557, 2006.
- [2] J. C. França-Silva, R. A. Barata, R. T. da Costa, et al., “Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil,” *Veterinary Parasitology*, vol. 131, no. 3–4, pp. 213–220, 2005.

- [3] L. M. Deane and M. P. Deane, "Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará," *O Hospital*, vol. 48, pp. 61–70, 1955.
- [4] O. Courtenay, R. J. Quinnell, L. M. Garcez, J. J. Shaw, and C. Dye, "Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 186, no. 9, pp. 1314–1320, 2002.
- [5] C. G. Nieto, M. García-Alonso, J. M. Requena, et al., "Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum* correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 67, no. 2, pp. 117–130, 1999.
- [6] A. Blavier, S. Keroack, P. Denerolle, et al., "Atypical forms of canine leishmaniosis," *Veterinary Journal*, vol. 162, no. 2, pp. 108–120, 2001.
- [7] E. Pinelli, R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. Del Real, and J. Ruitenber, "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*," *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 1, pp. 229–235, 1994.
- [8] M. J. Aisa, S. Castillejo, M. Gallego, et al., "Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 58, no. 2, pp. 154–159, 1998.
- [9] D. Talmi-Frank, D. Strauss-Ayali, C. L. Jaffe, and G. Baneth, "Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 13, no. 2, pp. 271–276, 2006.
- [10] A. A. De Paula, A. V. M. Da Silva, O. Fernandes, and A. M. Jansen, "The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro," *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 4, pp. 832–836, 2003.
- [11] A. V. M. da Silva, C. D. de Souza Cândido, D. de Pita Pereira, R. P. Brazil, and J. C. A. Carreira, "The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil," *Acta Tropica*, vol. 105, no. 1, pp. 92–94, 2008.
- [12] M. A. A. Cabrera, A. A. de Paula, L. A. B. Camacho, et al., "Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 45, no. 2, pp. 79–83, 2003.
- [13] M. E. Camargo, "Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 8, no. 5, pp. 227–235, 1966.
- [14] V. M. Passos, E. B. Lasmar, C. M. Gontijo, O. Fernandes, and W. Degraive, "Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 91, no. 1, pp. 19–20, 1996.
- [15] O. Francino, L. Altet, E. Sánchez-Robert, et al., "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis," *Veterinary Parasitology*, vol. 137, no. 3-4, pp. 214–221, 2006.
- [16] C. Dye, E. Vidor, and J. Dereure, "Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease," *Epidemiology and Infection*, vol. 110, no. 3, pp. 647–656, 1993.
- [17] R. J. Quinnell, O. Courtenay, L. M. Garcez, et al., "IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 91, no. 3-4, pp. 161–168, 2003.
- [18] M. Cabral, J. O'Grady, and J. Alexander, "Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs," *Parasite Immunology*, vol. 14, no. 5, pp. 531–539, 1992.
- [19] D. A. Ashford, J. R. David, M. Freire, et al., "Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 59, no. 1, pp. 53–57, 1998.
- [20] C. B. Palatnik-de-Sousa, W. R. Dos Santos, J. C. França-Silva, et al., "Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 65, no. 5, pp. 510–517, 2001.
- [21] R. Dietze, G. B. Barros, L. Teixeira, et al., "Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 25, no. 5, pp. 1240–1242, 1997.
- [22] E. D. Moreira Jr., V. M. Mendes de Souza, M. Sreenivasan, E. G. Nascimento, and L. Pontes de Carvalho, "Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission," *Veterinary Parasitology*, vol. 122, no. 4, pp. 245–252, 2004.
- [23] P. Abranches, M. C. D. Silva-Pereira, F. M. Conceição-Silva, G. M. Santos-Gomes, and J. G. Janz, "Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection," *The Journal of Parasitology*, vol. 77, no. 4, pp. 557–561, 1991.
- [24] G. Oliva, A. Scalone, V. F. Manzillo, et al., "Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 4, pp. 1318–1322, 2006.
- [25] L. Carrera, M. L. Fermín, M. Tesouro, et al., "Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers," *Experimental Parasitology*, vol. 82, no. 2, pp. 139–146, 1996.
- [26] A. B. Neogy, I. Vouldoukis, O. A. Silva, et al., "Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 47, no. 6, pp. 772–777, 1992.
- [27] C. Riera, J. E. Valladares, M. Gallego, et al., "Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate," *Veterinary Parasitology*, vol. 84, no. 1-2, pp. 33–47, 1999.

Short communication

The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil

Alba Valéria Machado da Silva^a, Claudia Dias de Souza Cândido^a, Daniela de Pita Pereira^c,
Reginaldo Peçanha Brazil^b, João Carlos Araujo Carreira^{a,*}

^a Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil, Cep: 21045-900, Fiocruz, Pavilhão 108, Sala 34, Laboratório de Toxoplasmose/FIOCRUZ, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/FIOCRUZ, Brazil

^c Laboratório de Bioquímica Molecular de Doenças Endêmicas/FIOCRUZ, Brazil

Received 20 April 2007; received in revised form 15 July 2007; accepted 7 September 2007

Available online 14 September 2007

Abstract

This paper is the first to report visceral leishmaniasis in domestic cats (*Felis catus domesticus*) from an endemic area in Rio de Janeiro state, Brazil. A relatively high seroprevalence of 25% was observed although none of them have presented any symptom. Our results support the observation of previous authors, suggesting that cats may be considered as alternative domestic hosts of visceral leishmaniasis and should be included in serological investigations performed in endemic areas.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: American visceral leishmaniasis; Cats; Indirect fluorescence assay; PCR; Rio de Janeiro

1. Introduction

In Brazil, besides being a rural zoonosis, American visceral leishmaniasis is becoming a peri-urban and even urban zoono-anthroponosis (França-Silva et al., 2005).

Originally, dogs were considered to be as the only domestic reservoirs of *Leishmania (infantum) chagasi* in Brazil (Deane and Deane, 1955). However, the increasing number of cases of feline leishmaniasis described in the literature since 1990 suggest cats may also have some role in the epidemiology of visceral leishmaniasis (Mancianti, 2004).

In the present study, we described the first cases of feline visceral leishmaniasis (FVL) in Rio de Janeiro state, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Cat populations

Eight cats from an endemic area in Rio de Janeiro city were tested by IFA. The animals comprised mainly

domestic shorthair adults with little access to veterinary care.

A clinical evaluation that included palpation of lymph nodes and an assessment of general health status of the animal was carried out at the time of blood collection.

A group of eight cats was used as a negative control, four cats from an area free of AVL and four from the endemic area.

Blood was collected by cephalic vein puncture. Blood samples were allowed to clot and serum separated by centrifugation and stored at -20°C until use.

The work has been carried out were in accordance with guidelines defined by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Foundation Rio de Janeiro, Brazil.

2.2. IFA

The assay was that previously described by Camargo (1966) with the antigen of *L. (i.) chagasi* promastigotes (strain L-579) from axenic culture in NNN+LIT media at the exponential growth phase. Goat anti-feline IgG FITC was used (Serotec, Oxford, UK). Serum dilutions ranging from 1:10 to 1:2560 were tested and reaction titers from 1:40 were adopted as positive.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2598 4251; fax: +55 21 2560 6572.

E-mail addresses: albavmsilva@click21.com.br (A.V.M. da Silva), souzacandido@infolink.com.br (C.D. de Souza Cândido), rpbrasil@ioc.fiocruz.br (R.P. Brazil), carreira@ioc.fiocruz.br (J.C.A. Carreira).

2.3. PCR

For DNA isolation and PCR analysis, cats' blood samples were mixed with a solution of Guanidine-EDTA in a proportion of 1:1 and after 24 h the mixture were boiled for 1 min and kept at 4 °C up to DNA extraction. The samples were submitted to phenol–chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA pellets were resuspended in 50 µl of 0.1× TE buffer (pH 8.0). Ten microlitres portions of DNA extracts were used for PCR amplification. Rigorous procedures were assumed to avoid possible contaminations, for example the inclusion of negative control sample in the DNA extraction step and decontamination of instruments and working areas with diluted chloride solution and UV rays. Total DNA was also obtained from cultured *L. (L.) chagasi* promastigotes (MHOM/BR/1974/PP75) used as a positive control. Parasites were harvested in late log phase and washed in PBS prior to DNA isolation. After lysis in TE buffer containing proteinase K, DNA was extracted by phenol–chloroform and ethanol precipitation, as described above cats blood samples.

For the PCR multiplex assay, one primer pairs were used. The primers [5'-GGCCCACTATATTACACCAA-CCCC-3' and 5'-GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3'] were employed to amplify the conserved region of kinetoplastic minicircle DNA from *Leishmania* spp. (Passos et al., 1996). The reactions were carried out in a final volume of 100 µl containing 1× Taq polymerase buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP (Invitrogen), 0.2 µM of each primer, 1.25 U Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 µl DNA sample. The mixture was incubated in a Perkin-Elmer thermocycler (GeneAmp PCR System 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 94 °C for 12 min for enzyme activation (hot-start PCR), followed by 35 cycles, each consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C. After the last cycle, the extension was continued for a further 10 min at 72 °C. Ten microlitres of the amplification reaction product were resolved in 2% agarose gel electrophoresis and visualised under UV transillumination.

2.4. Dot blot analysis to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection

The amplified products were also analysed by dot blot hybridisation using a *L. infantum*-specific biotinylated probe [5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'] (Francino et al., 2006). Briefly, the amplified products (10 µl) were denatured in 0.4N NaOH before application to nylon membranes (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), using a manifold vacuum device (Bio-DotTM; BioRad, Richmond, CA, USA). After addition of the biotinylated probe (5 ng/ml), hybridisation reactions were performed overnight at 46 °C in BLOTTO (1.5× saline–sodium–citrate buffer containing 1% sodium dodecyl-sulfate, 0.5% skim milk). Filters were washed five times using 0.05% Tween-20 (Bio-Rad) in PBS-Tween-20, at 25 °C for 5 min each, before incubation with a streptavidin–peroxidase conjugate diluted 1:100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) in the

same buffer at 25 °C for 1 h. The membranes were then washed five times with PBS-Tween-20, each time for 5 min at 25 °C, hybridisation reactions were revealed using Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology). Each experiment included a negative control and positive control.

3. Results

Seroprevalence of 25% was observed among the examined cats (2/8) in a preliminary serological investigation. Positive serological titers were 1:40 and 1:320 and none of the seropositive animals showed any symptoms of VL.

Sera from negative cats of a non-endemic area from Rio de Janeiro were not reactive or reactive at a dilution of 1/10 and negative controls from the study area did not exceed reactivity at the dilution 1:20.

In the results of PCR, all samples studied were realized in duplicate. In the visualization of the amplification products in agarose gel of the three cats samples, two were positives, amplifying the product of 120 pb, corresponding to the conserved kDNA region of *Leishmania* sp.

After hybridization of this amplified product with an specific probe for *L. infantum*, the positive samples were confirmed as *Leishmania (i.) chagasi* all negative samples maintained negative.

4. Discussion

This study is the first to report an autochthonous case of domestic cats infected by *L. (i.) chagasi* in Rio de Janeiro state, Brazil. The examined cat lived in a peri-urban endemic area where *Lutzomyia longipalpis* was found to represent 19% of the total sand fly population (data not shown). In this same area 11 human cases with VL were notified and with a high animal host seroprevalence, 56.7% of the dogs (data not shown), and 29% of the opossums (Cabrera et al., 2003).

While there has been an increase number of reported cases of feline visceral leishmaniasis, we believe they are still under reported as: (1) most of the cases are diagnosed after animals become symptomatic or during vaccination programs; (2) few serological surveys have been carried out in endemic areas; (3) there are difficulties in clinically distinguishing leishmaniasis from other diseases like viruses, fungal infections and tumors.

In the Old World, it has been suggested that cats could act as a reservoir host of VL, rather than just an incidental one, because they present high seropositivity, can be infected for several months, and can be bitten by sandflies which are competent vectors (Martín-Sánchez et al., 2007). In the New World, it is likely that we have a similar situation with FVL, because cats can be bitten by the local vector (*L. longipalpis*) (Dias et al., 2003) and numerous reports of frequent skin lesions with amastigotes presence (Savani et al., 2004). In addition, cats are nocturnal predators with a home range average length of 1.5 km (Underhill-Day, 2005). Domestic cats may make incursions into forest areas could act as a link between the sylvatic and domestic environments, favoring the dissemination of the parasite.

In conclusion, we think the cats should be included in serological investigations during LV control campaigns performed in endemic areas.

Acknowledgements

This work received financial support from CNPq/Fiocruz—Papes IV and from Instituto Oswaldo Cruz.

References

- Cabrera, M.A.A., De Paula, A.A., Camacho, L.A.B., Marzochi, C.A., Aguiar, G.M., Xavier, S.C., Da Silva, A.V.M., Jansen, A.M., 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 45, 79–83.
- Camargo, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved cultured forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8, 227–234.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital* 48, 61–70.
- Dias, F.O.P., Lorosa, E.S., Rebêlo, J.M.M., 2003. Blood feeding sources and peridomestication of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública* 19, 1373–1380.
- França-Silva, J.C., Barata, R.A., da Costa, R.T., Monteiro, E.M., Machado-Coelho, G.L.L., Vieira, E.P., Prata, A., Mayrink, W., Nascimento, E., Forte-Dias, C.L., da Silva, J.C., Dias, E.S., 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais. *Brazil Vet. Parasitol.* 131, 213–220.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Mancianti, F., 2004. Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico? *Parasitologia* 46, 203–206.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267–273.
- Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M., Fernandes, O., Degraive, W., 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Vianina)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 19–20.
- Savani, E.S.M.M., Camargo, M.C.G.O., Carvalho, M.R., Zampieri, R.A., dos Santos, M.G., D'Áuria, S.R.N., Shaw, J.J., Floeter-Winter, L.M., 2004. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia Country, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 120, 229–233.
- Underhill-Day, J.C., 2005. A Literature Review of Urban Effects on Lowland Healths and Their Wildlife. *English Nature Res.* p. 8.