

Ministério da Saúde

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

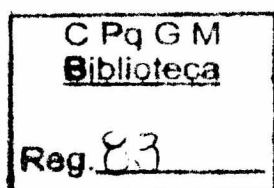
Combinação de Captura Dirigida e PCR na Detecção de Flebotomíneos Naturalmente Infectados por Leishmanias

por

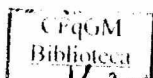
José Carlos Miranda

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências, na área de Entomologia.

**Orientador : Profa. Dra. Aldina Maria do Prado Barral
Fundação Oswaldo Cruz / CPqGM / Salvador – Bahia.**



**Rio de Janeiro – RJ
Dezembro - 1998**



Ministério da Saúde

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta Dissertação intitulada :

Combinação de Captura Dirigida e PCR na Detecção de Flebotomíneos Naturalmente Infectados por Leishmanias

apresentada por

José Carlos Miranda

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Elizabeth Ferreira Rangel

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias

Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação defendida e aprovada em 18 de Dezembro de 1998

**À minha esposa e companheira,
Lígia**

**Aos meus filhos,
Daniel, Lucas e Fábio**

**Aos meus pais,
José e Dirce**

Agradecimento especial à

Dra. Aldina Barral

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento da dissertação ocorreu em várias etapas e sua conclusão somente foi possível devido aos diversos colaboradores citados abaixo :

Dr. Albert Scheriefer, contribuiu com a revisão da dissertação, principalmente nas etapas relacionadas com a Biologia Molecular e fotos apresentadas.

Ana Christina Caldeira de Campos, realizou a revisão bibliográfica, ficha catalográfica e todo apoio oferecido pela Biblioteca da FIOCRUZ/Ba.

Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, orientou na realização das pesquisas bibliográficas e todo apoio oferecido pela Biblioteca da FIOCRUZ/Ba.

Dr. Edelberto Santos Dias, orientou na identificação e biologia dos flebotomíneos da área em estudo através de estágio na FIOCRUZ-MG.

Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, forneceu apoio necessário para o desenvolvimento do trabalho no campo e incentivou a idéia inicial do projeto.

Ednaldo Lima do Lago, colaborou com o trabalho geral de campo, realizando a triagem dos pacientes, localização das residências dos pacientes e apoio nas diversas etapas relacionadas com os flebotomíneos.

Eliana Reis, colaborou com a realização das diversas etapas técnicas envolvendo a Biologia Molecular.

Itamar Crispin, fotografias, slides e encadernação.

Jackson Lemos, digitação de textos e tabelas.

Lígia Pessoa Neves Miranda, revisão ortográfica nas diversas etapas da dissertação.

Lucas Neves Miranda, digitação de textos, tabelas e gráficos.

Luiz Fabiano Borges Oliveira, fotografias e slides.

Dr. Manoel Barral Neto, incentivou a idéia inicial e proporcionou apoio que tornou possível a execução do projeto nas etapas de campo e laboratório.

Dra. Maria Clara Melro, cedeu o laboratório de Parasitologia/ICS/UFBA para a manutenção de uma colônia, montagem e identificação de flebotomíneos.

Dra. Maria de Fátima Dias Costa, orientou na realização de créditos no Mestrado de Imunologia da UFBA.

Dra. Marilda Gonçalves, orientou nas etapas relacionadas com a Biologia Molecular.

Maria Neuza Santos Souza do Lago, colaborou com a triagem dos pacientes no posto médico de Corte de Pedra - Ba.

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, orientou nas etapas relacionadas com a Biologia Molecular e proporcionou todo o apoio Institucional da FIOCRUZ/BA.

Dr. Otávio Fernandes, realizou a Hibridização das amostras na FIOCRUZ/RJ.

Dr. Paulo Almeida, proporcionou o apoio institucional do Departamento de Biointeração do ICS/UFBA.

Dr. Philip Marsden (em memória), participou da discussão da idéia inicial do trabalho e incentivou sua realização.

Dr. Reginaldo Brasil, orientou na manutenção de uma colônia de flebotomíneos em laboratório através de estágio na FIOCRUZ-MG.

Prof. Renato Gazar Miguel, realizou a identificação dos fungos que invadiam a colônia de flebotomíneos no ICS/UFBA.

Rosália Meire Oliveira da Silva, forneceu apoio através da secretaria do Mestrado de Patologia da FIOCRUZ/BA.

Tânia Rodrigues de Farias, fotografias, slides e encadernação.

Theolis Costa Barbosa, fotografias e slides.

Dra. Vanise Macedo, forneceu apoio no desenvolvimento do trabalho de campo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Considerações gerais.....	6
1.2 Os reservatórios.....	9
1.3 O vetor.....	11
1.4 Métodos de detecção da infecção natural.....	19
<u>1.4.1 Morfológico e cultivo.....</u>	19
<u>1.4.2 Biologia Molecular.....</u>	20
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Área do estudo.....	22
3.2 Coleta de flebotomíneos no campo.....	24
3.3 Acondicionamento dos flebotomíneos.....	27
3.4 Obtenção de flebotomíneos em laboratório.....	27
3.5 Criação de <i>Lutzomyia whitmani</i> em laboratório.....	28
3.6 Identificação dos flebotomíneos.....	30
3.7 Extração de DNA total dos flebótomos	31
3.8 Amplificação da região constante de minicírculos de KDNA por PCR.....	32
3.9 Análise eletroforética de PCR e confirmação da identidade dos amplicons por <u>Dot-blot</u>	32
4 RESULTADOS	34
4.1 A coleta de flebotomíneos.....	34
4.2 As amostras para diagnóstico pelo PCR.....	35

4.3	Padronização do PCR para detecção de <i>Leishmania braziliensis</i> em flebótomos.....	40
4.4	Detecção de <i>L. braziliensis</i> em amostras de flebótomos por PCR e <u>Dot-Blot</u>	41
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8	APÊNDICE.....	68
8.1	Ficha de captura de flebotomíneos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

Leishmania braziliensis - Leishmania (Viannia) braziliensis

Leishmania guyanensis - Leishmania (Viannia) guyanensis

Leishmania amazonensis - Leishmania (Leishmania) amazonensis

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

L. - Lutzomyia

L. - Leishmania

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS, FIGURAS E TABELAS

Gráfico 1 - Dados pluviométricos.....	22
Figura 1 – Localização do município de Presidente Tancredo Neves.....	23
Figura 2 - Armadilha de Shannon modificada.....	25
Figura 3 - Capturador manual de aspiração.....	26
Figura 4 - Domicílio e peridomicílio com alta densidade de flebotomíneos.....	28
Figura 5 – Avaliação da sensibilidade do teste PCR.....	41
Figura 6 - Amostras em gel de agarose	44
Figura 7 - Localidades em que foram coletados flebotomíneos e localidades com capturas positivas no município de Presidente Tancredo Neves.....	47
Figura 8 - Localidades em que foram coletados flebotomíneos e localidades com capturas positivas no município de Teolândia.....	48
Figura 9 - Localidades em que foram coletados flebotomíneos no município de Wenceslau Guimarães.....	49
Figura 10 - Dot-blot dos produtos de PCR das amostras utilizando sondas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>.....	51

Tabela 1 – Captura de flebotomíneos (fêmeas) no domicílio e peridomicílio de 45 pacientes.....	34
Tabela 2 - Flebotomíneos machos capturados no domicílio e peridomicílio	35
Tabela 3 - Número de amostras coletadas e a data de captura	36
Tabela 4 - Data da captura, localidade e número da amostra.....	37
Tabela 5 - Localidades com flebotomíneos coletados, pacientes e população.....	39
Tabela 6 - Avaliação dos grupos utilizados através da eletroforese em gel de agarose e hibridização	42
Tabela 7- Flebotomíneos positivos pelo PCR no domicílio e peridomicílio	43
Tabela 8 – Localidades com capturas positivas pela hibridização, o número da captura e o número das amostras.....	46
Tabela 9 - Positividade de flebotomíneos relacionada com o Município.....	50

RESUMO

Os relatos sobre índice de infecção natural de flebótomos, por promastigotas de leishmania, em focos endêmicos de Leishmaniose Tegumentar Americana variam de 0 a 1,19%, o que, aparentemente não justifica a alta transmissão da doença. Na maioria das vezes, a técnica utilizada para detectar a infecção do flebótomo, é baseada na dissecação e exame do aparelho digestivo desses dípteros. Quando a captura foi direcionada para próximo de uma casa com um caso humano de infecção recente (mais ou menos 15 dias), foi encontrado 1 flebótomo positivo em 193 examinados. Decidimos então, utilizar a Reação de Polimerase em Cadeia para detecção de leishmania em flebotomíneos capturados no domicílio e peridomicílio, de casos recentes de leishmanioses, para avaliar a infecção natural de flebotomíneos, na área endêmica de Corte de Pedra, Bahia. Coletamos 4.027 fêmeas de flebotomíneos em 79 capturas e agrupamos em 335 amostras (10 ou 20 flebótomos por amostra). As amostras foram acondicionadas em criotubos e conservadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA. Para as Reações de Polimerase em Cadeia, foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam a região conservada da molécula do minicírculo da leishmania: 5' GGG G/TAG GGG CTG TCT GCG AA 3' e 5' GGC CCA CTA TAT ACC CCC 3' e 5' CCG CCC CTA TTA TAC ACC AAC CCC 3'. A sensibilidade da técnica de PCR para a detecção de leishmania foi avaliada testando culturas com 10, 100 e 1000 leishmania misturadas com 10 ou 20 flebótomos em cada tubo. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, corado pelo brometo de etídio, visualizado sob luz ultra violeta, e foi possível hibridizar com sondas para os subgeneros *Viannia* e *Leishmania*. Nós conseguimos detectar DNA de leishmania, em amostras, contendo aproximadamente, 10 parasitos com 10 ou 20 flebótomos. Os resultados obtidos em gel de agarose, mostraram 11 amostras positivas. Após a hibridização foram observadas um total de 30 amostras positivas (incluindo as 11 positivas no exame pela ultra violeta). Na hibridização, foram utilizadas sondas que correspondiam a moléculas clonadas dos segmentos do minicírculo de *Leishmania (Viannia) panamensis*, IPAN V, número de acesso no Gene Bank U19811 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, MHOM/BR/73 M2269, número de acesso no Gene Bank U198/0. Na área do estudo ocorre a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Considerando que em cada amostra positiva continha apenas um exemplar infectado, a proporção de flebótomos infectados foi 0,74% quando comparada ao número total de flebótomos examinados e 8,95% quando relacionada aos grupos de flebótomos. Esses resultados mostram que o uso da Reação de Polimerase em Cadeia em amostras coletadas próximas a casas de pacientes recentemente diagnosticados para leishmanioses, melhora a detecção de flebotomíneos infectados por leishmania, em áreas endêmicas e pode ser uma ferramenta útil para avaliar o padrão de infecção por leishmania.

ABSTRACT

Natural infection of *Lutzomyia spp* with leishmania in endemic areas is very low (ranging from 0 to 1,19%). When the capture was performed near the house of a very recent case of the human infection there was 1 positive phlebotomine out of 193 examined. We decided to evaluate the polimerase chain reaction in the detection of leishmania in phlebotomine captured in the neighborhood of a house from a very recent case of leishmaniasis to evaluate the natural infection of *Lutzomyia spp* in the endemic area of Corte de Pedra. We have captured 4027 female sandflies from 79 captures, and grouped in 335 samples (10 or 20 sandflies/samples). Samples were stored in liquid nitrogen before total DNA extraction. Polimerase Chain Reaction was performed with a oligonucleotide primers that amplify the conserved region of the *Leishmania* minicircle molecule : 5' GGG G/TAG GGG CTG TCT GCG AA 3' and 5' GGC CCA CTA TAT ACC CCC 3' and 5' CCG CCC CTA TTA TAC ACC AAC CCC 3'. The sensitivity of the Polimerase Chain Reaction technique for the detection of leishmania was evaluated by testing cultures spiked with 10, 100 and 1000 leishmania mixed with 10 or 20 sandflies at same tube. Amplified products were submitted to gel agarose electrophoresis, ethidium bromide-stained and visualized under ultra violet light, and hybridized with probe for *Leishmania (Viannia) panamensis*, IPAN V, Gene Bank access number U19811 and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, MHOM/BR/73 M2269, Gene Bank access number U198/0. In the area both *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (braziliensis) amazonensis* are found. We were able to detect leishmanial DNA in samples containing an estimated 10 parasites with 10 or 20 sandflies. Inspection of the agarose gels showed 11 positive samples. Hybridization increased this yield to a total of 30 samples (including the 11 positive by ultra violet inspection). Even if we assume that each positive pool contains a single infected specimen, the proportion of infected sandflies was 0.74% when compared at the total number of sandflies and 8.95% when compared to the sandflies groups. These results show that the use of Polimerase Reaction Chain in samples captured near the houses of recently diagnosed leishmaniasis patients improves the detection of leishmania-infected phlebotomine in endemic areas and may be a helpful tool for evaluating patterns of leishmania infection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Filo Sarcostomatophora, Ordem Kinetoplastida, Família Tripanosomatidae), que apresentam diferentes formas clínicas, dentre elas as formas visceral e tegumentar. Estas protozoonoses, têm despertado atenção especial quanto a sua importância médica e econômica, encontrando-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) entre as seis doenças infecto-parasitárias listadas como de maior importância pela Organização Mundial da Saúde (PEREIRA & FONSECA, 1994).

Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* no mundo. Em 82 países, as leishmanioses são consideradas doenças endêmicas, totalizando uma incidência anual de 600.000 casos e uma prevalência de 12 milhões de casos (DESJEUX, 1992). Nas Américas, a LTA se distribui, desde o Texas até o norte da Argentina, não havendo relato de casos apenas no Canadá, Chile e Uruguai (BRANDÃO-FILHO & SHAW, 1994; FNS, 1993; GRIMALDI et al., 1989; LAINSON, 1983; LAINSON & SHAW, 1987). Já no Brasil, as leishmanioses incluem-se no quadro das grandes endemias, que vêm apresentando, um processo de expansão e crescimento (SABROSA et al., 1995). No período de 1985 à 1995, ocorreu um aumento de 151% (10.49 em 1985 e 22.24 casos/habitantes em 1995) na incidência da LTA. No ano de 1995 as regiões Norte e Nordeste do país participaram com, respectivamente, 35 e 45% dos casos notificados (OLIVEIRA, 1996).

Na Bahia, a transmissão da LTA ocorre principalmente na área rural, sendo a doença endêmica em praticamente todo o Estado, com surtos epidêmicos registrados em várias localidades. O distrito sanitário de Ilhéus é o que apresenta o maior número de casos do Estado,

englobando várias localidades da região, dentre elas, Três Braços e Corte de Pedra (JONES et al., 1987). Nessas áreas endêmicas 85% dos pacientes cadastrados eram lavradores (COSTA et al., 1988). A *Leishmania braziliensis* é a espécie envolvida na doença nesta região (CUBA et al., 1984), embora casos de LTA por *Leishmania amazonensis* também tenham sido documentados (BARRAL et al., 1991).

As leishmanias são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor, principalmente nas formas promastigotas, ou flageladas; e nos tecidos dos hospedeiros vertebrados nas formas amastigotas, ou aflageladas (LAINSON et al., 1986). De acordo com caracteres bioquímicos, imunológicos e biológicos associados aos critérios clássicos de morfologia, desenvolvimento biológico nos hospedeiros e em meio de cultura, e distribuição geográfica já amplamente utilizados, LAINSON & SHAW (1987) agruparam os representantes do gênero *Leishmania* causadores de LTA no Novo Mundo, nos subgeneros *Viannia* (complexo *braziliensis*) e *Leishmania* (complexo *mexicana*), compreendendo as seguintes espécies:

Complexo *Leishmania braziliensis* ou Complexo *braziliensis*

- *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- *Leishmania (Viannia) guyanensis*
- *Leishmania (Viannia) panamensis*
- *Leishmania (Viannia) peruviana*
- *Leishmania (Viannia) lainsoni*
- *Leishmania (Viannia) naiffi*
- *Leishmania (Viannia) shawi*
- *Leishmania (Viannia) colombiensis*

Complexo *Leishmania mexicana* ou Complexo *mexicana*

- *Leishmania (Leishmania) mexicana*
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*
- *Leishmania (Leishmania) enriettii*
- *Leishmania (Leishmania) aristidesi*

As principais formas clínicas de LTA encontradas no Brasil são causadas pelos seguintes agentes etiológicos:

- ***Leishmania (Viannia) braziliensis*** – Responsável pela maioria dos casos de LTA no Brasil. A doença se apresenta com lesões cutâneas únicas ou múltiplas que podem evoluir para forma mucosa (BARRAL et al., 1991; GRIMALDI et al., 1989; LAINSON, 1983). Um aspecto clínico-epidemiológico importante na LTA observado na região de Três Braços e Corte de Pedra, é o comprometimento dos linfonodos. BARRAL et al. (1992), examinando 36 doentes com LTA, em Três Braços, cita a presença de linfadenopatia em 66,7%, dos quais 62% tiveram cultura do aspirado ganglionar positiva, sendo caracterizado em 11, *L. braziliensis*. Posteriormente, BARRAL et al. (1995), descreveram 10 casos de LTA onde a linfadenopatia foi o primeiro sinal da doença, dos quais 7 evoluíram com o aparecimento da lesão ulcerada e 3 regrediram a linfadenopatia, não apresentando outras lesões, alertando para o fato de que em área endêmica, a linfadenopatia pode ser um indicador de infecção leishmaniótica.
- ***Leishmania (Viannia) guyanensis*** – Causa Leishmaniose Cutânea ou “pian-bois”, no Norte do Brasil. Ocorre no Norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima e Pará). A doença se apresenta com lesões únicas ou múltiplas, com raro comprometimento mucoso (NEVES, 1995).
- ***Leishmania (Leishmania) amazonensis*** – Causa Leishmaniose Cutânea e Cutânea Difusa no Brasil. Doença que ocorre principalmente nos Estados da Região Amazônica (Amazonas, Pará e Rondônia) e Sudoeste do Maranhão e Bahia. Foram também descritos casos de Leishmaniose Mucosa e Visceral (BARRAL et al., 1991).

1.2 Os reservatórios

A Leishmaniose Tegumentar Americana é primariamente uma enzootia de animais silvestres. A transmissão ao homem ocorre quando este penetra nas áreas onde a doença ocorre, passando a ter um caráter zoonótico. No mamífero considerado o hospedeiro natural do parasito, raramente a leishmania produz doença, e a infecção tende a permanecer benigna, contudo, em hospedeiros acidentais, como o homem e alguns animais domésticos, a infecção produz lesões na pele.

No Brasil, as espécies de *Leishmania* que parasitam o homem possuem diferentes reservatórios naturais e vetores. Este fato pode ser explicado pela estreita relação que ocorre entre determinadas espécies de flebotomíneos e sua fonte alimentar. Assim, o ciclo epidemiológico de algumas espécies de *Leishmania* ocorre no topo das árvores, entre animais arborícolas e vetores, enquanto que em outras espécies do parasito, o ciclo ocorre na base das árvores, ao nível do solo, entre roedores terrestres e vetores aí existentes, ou mesmo no peridomicílio, e até no domicílio.

Até o presente momento, pouco se conhece sobre os reservatórios naturais da *L. braziliensis*. Parasitos dessa espécie já foram isolados de alguns exemplares de roedores das espécies *Akodon cursor*, *Proechimys dimidiatus* e *Oryzomys sp.* (NEVES et al., 1995). LAINSON & SHAW (1979), incriminaram os animais arborícolas, como a preguiça (*Choloepus didactylus*) e o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), como reservatórios naturais de *Leishmania guyanensis* na Amazônia. ARIAS & NAIF (1981), observaram que na área periurbana de Manaus (AM), onde florestas são substituídas por conjuntos habitacionais, a mudança ambiental, resulta na aproximação de animais silvestres como o gambá, *Didelphis marsupialis*, freqüentemente parasitados por *L. guyanensis*.

Os reservatórios da *Leishmania amazonensis*, são encontrados freqüentemente em florestas de terrenos baixos como igapós, várzeas e

capoeiras. Os principais reservatórios identificados foram roedores das espécies *Proechimys guyanensis*, *Oryzomys capito*, *Oryzomys macconneli*, *Oryzomys laticeps* e *Neacomys spinosus*, e o marsupial *Didelphis albiventris* (NEVES et al., 1995).

BARRETTO et al. (1985), na região endêmica de Leishmaniose Tegumentar de Três Braços e Corte de Pedra, examinaram 600 animais silvestres e encontraram infecção natural em três roedores da espécie *Proechimys iheringi denigratus* infectados por *Leishmania amazonensis*, apesar de predominar na região *Leishmania braziliensis*.

Várias espécies de animais domésticos também têm sido encontradas infectadas com freqüência. BARRETTO et al. (1984), realizaram um inquérito canino em Três Braços-Bahia, onde foram estudados 98 cães, sendo que 3% dos animais apresentavam lesões e formas amastigotas de *L. braziliensis*.

Na área rural de Viana (ES), FALQUETO et al. (1986), encontraram 17,2% dos cães (*Canis familiaris*) infectados por *L. braziliensis*. No povoado de Canoa (BA), OLIVEIRA (1986), encontrou 8% de cães infectados e no município de Itarana (ES) FALQUETO et. al. (1991), examinaram 56 cães e detectaram 12% deles infectados, sendo 7% por *L. braziliensis*.

Em Corte de Pedra (BA), BARRETTO et al., (1986), examinaram 76 equídeos e encontraram 6,2% dos burros (*Equus asinus*) infectados por *Leishmania braziliensis braziliensis*. No município de Canoa (BA), OLIVEIRA (1986), encontrou 22% dos equídeos positivos pela sorologia. Outros autores também mostraram o possível papel dos equídeos, na cadeia epidemiológica da LTA (AGUILAR et al., 1984; BONFANTE-GARRIDO & BARRETO, 1981; FALQUETO et al., 1987; PONS & LONDRES, 1968; VEXENAT et al., 1986c).

1.3 Os vetores

Os flebotomíneos são insetos da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae que transmitem ao homem as leishmanioses, a bartonelose (verruga peruana) e a febre papatasi (febre dos três dias), tendo como agentes etiológicos, respectivamente, protozoários, bactérias e flebovírus (FORATTINI, 1973; PESSOA & MARTINS, 1977). Estão distribuídos em dois gêneros com importância médica. No gênero *Phlebotomus*, estão os vetores das leishmanioses no Velho Mundo (Ásia e África), e no gênero *Lutzomyia* encontram-se as espécies responsáveis pela transmissão das leishmanioses, nas Américas (NEVES et al., 1995).

Os flebotomíneos são insetos pequenos (0,3 a 0,4 mm) que, devido aos seus aspectos físicos, recebem várias denominações populares, como “mosquito palha”, devido a sua coloração semelhante à palha vegetal; “asa branca”, “asa dura” ou “anjinho”, porque possuem asas de formato lanceolado, que na posição de pouso permanecem levantadas, com pequena inclinação; “tatuquira”, pelo hábito de se abrigarem em buracos de tatu; “arrepinado”, por possuírem o corpo piloso; “pula-pula”, por ficarem saltitando nos locais de pouso; “cangalhinha”, porque após a hematofagia, o estômago posterior das fêmeas se dilata e ocupa quase toda a cavidade abdominal, assemelhando-se a uma cangalha de animal. (FORATTINI, 1973).

Para reproduzirem, os flebotomíneos põem os ovos de maneira esparsa no substrato, onde ficam aderidos a uma substância viscosa, que é um produto de secreção das glândulas acessórias. A média de incubação é de 7 a 15 dias, de acordo com a espécie.

As larvas dos flebotomíneos são de ambiente terrestre, não se criam em ambiente aquático; necessitam de muita umidade, pouca luz e abundância de matéria orgânica para a sua nutrição, desenvolvendo-se sob a camada de folhas mortas que revestem o solo, nas frestas das

rochas, no meio de detritos vegetais acumulados em ocos de árvores, nos espaços entre raízes tubulares e em outros pequenos criadouros em que haja elevado teor de umidade e abundante matéria orgânica. As pupas não se locomovem e não se alimentam, ficando fixas pela extremidade posterior da exúvia, em posição ereta. O período médio desta fase varia em torno de 15 a 20 dias. Após a eclosão, a forma adulta liberta-se através de uma fenda longitudinal mediana, localizada na face dorsal da pupa. Por essa abertura, emerge em primeiro lugar o tórax, seguido da cabeça, asas, patas e abdômem. Após a libertação, que dura alguns minutos, o flebótomo adulto se mantém pousado e com pouca mobilidade, necessitando de algum tempo para o endurecimento da quitina que o reveste (FORATTINI, 1973).

A maioria dos flebotomíneos são silvestres e atacam o homem e os animais domésticos quando as habitações são próximas a mata. Possuem um reduzido poder de vôo; algumas espécies são consideradas ecléticas quanto ao local de abrigo, e, devido a modificação do habitat, pelo homem, vão se adaptando ao peridomicílio e ao domicílio (FORATTINI, 1973).

Os flebotomíneos possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia, embora possuam também hábitos matutinos e vespertinos no interior das matas (FORATTINI, 1973).

Apenas as fêmeas são hematófagas, e o repasto sangüíneo completo dura cerca de 3 a 5 minutos, porém, antes de introduzir a probóscida (peças bucais picadoras), realizam várias tentativas de sucção, até encontrar o local adequado. O repasto está completo quando, da extremidade posterior do abdômem sai uma gotícula de sangue. A alimentação sangüínea é necessária para que ocorra o amadurecimento do folículo ovariano e ovos férteis. Os machos se alimentam de seiva de vegetais (FORATTINI, 1973).

O mecanismo de transmissão pela picada inicia-se quando, ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, o flebótomo ingere sangue com macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No interior do tubo digestivo, as amastigotas se multiplicam por divisão binária, e se transformam em promastigotas, que também se multiplicam por divisão binária ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma matriz secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a matriz se rompe e parte das promastigotas se transformam em paramastigotas que permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal. Novamente, ocorre transformação em promastigotas que migram através do estômago em direção à faringe do inseto. Após a migração, voltam às formas paramastigotas aderentes, que se diferenciam em pequenas promastigotas, altamente móveis, que se deslocam para a probóscida do inseto. Após 5 a 7 dias, ocorre a necessidade de realizar novo repasto sangüíneo. Antes de iniciar esta nova sucção, ocorre um regurgitamento das formas promastigotas que, juntamente com a saliva do inseto, invadem o tecido do hospedeiro (FORATTINI, 1973; NEVES et al., 1995).

Segundo NEVES et al. (1995), as principais espécies antropófilas descritas como importante vetor na transmissão da LTA são:

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani

As principais características morfológicas (YOUNG & DUNCAN, 1994) desta espécie são:

- quinto segmento do palpo menor ou equivalente aos do terceiro ou segundo; fórmula palpal 1:4:5:3:2;
- cibário apresentando cinco a seis pares de dentes horizontais, estiletiformes e bem separados.
- espermateca com o corpo segmentado, apresentando cabeça volumosa e corpo em forma de “espinha de peixe”, com aproximadamente dez anéis;

- dististilo dotado de quatro espinhos, sendo um terminal, um inserido no terço distal e dois situados no mesmo nível;
- parâmero com a porção basal dilatada e a distal delgada, dando a aparência de um dedo indicador em riste;
- extremidade distal dos ductos ejaculadores dilatada e em forma de uma colher, quatro a cinco vezes o comprimento da bomba.

O comum desta espécie é ocorrer em locais onde as florestas primárias são destruídas, tendo como conseqüência a invasão dos flebotomíneos no ambiente peridoméstico. Sendo considerado um importante vetor de *L. braziliensis* no Nordeste e Sudeste do Brasil, mais recentemente, no Pará e Guiana Francesa também participa como vetor da *L. guyanensis*. Na região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, e no Espírito Santo, a transmissão da LTA ocorre em áreas ocupadas por floresta secundária, atingindo principalmente moradores da zona rural. Nestas áreas, a transmissão também ocorre no peridomicílio, onde é comum a plantação de bananas, podendo se estender ao domicílio. Isto demonstra que flebotomíneos, originalmente silvestres, estão cada vez mais se aproximando do peridomicílio, como é o caso da *Lutzomyia whitmani*, que, na Amazônia, se restringe aos troncos de árvores, mostrando pouca disposição de picar o homem, e em áreas do Nordeste e Sudeste do Brasil é considerado importante vetor, tanto no ambiente silvestre, quanto no peridomicílio. A *L. whitmani* invade pouco o ambiente intra-domiciliar (NEVES, 1995).

No Brasil, a espécie *L. whitmani* tem sido prevalente em áreas onde a transmissão da LTA é evidente, e a sua prevalência em determinados focos, em diferentes regiões, associada ao encontro de espécimens infectados naturalmente por leishmania pertencente ao sub-gênero *Viannia*, incrimina esta espécie como uma das responsáveis pela transmissão de leishmanioses no país. Diferenças no comportamento e na fisiologia de populações geograficamente distintas de *L. whitmani* têm sugerido a existência de um complexo de espécies, e após o estudo dessa espécie em Ilhéus-BA, Martinho Campos-MG, Corte de Pedra-BA,

Baturité-Ce e Amaraji-PE, onde a transmissão de *L. braziliensis* é ativa, foi constatado diferenças nos caracteres morfológicos, e o estudo fenético demonstrou a existência de dois grupos distintos de *L. whitmani* (BARATA et al., 1996; 1997).

Estudos anteriores (VEXENAT et al., 1986b) determinaram a fauna flebotomínica da região de Três Braços (distante 60 Km de Corte de Pedra). Foram coletados 13.535 exemplares na mata, peridomicílio e domicílio. *Lutzomyia whitmani* (ANTUNES & COUTINHO, 1939) predominou no domicílio com 97,5% e no peridomicílio com 99%. Na floresta *Lutzomyia ayrozai* predominou com 31,1%, seguido por *Lutzomyia yulli* (19,4%), *Lutzomyia ficheri* (9,2%), *Lutzomyia hirsuta* (7,0%), *Lutzomyia flaviscutellata* (3,6%) e *L. whitmani* (1%). Este baixo índice de *L. whitmani* na floresta leva a suspeita de que as leishmanioses nesta região ocorram predominantemente no domicílio e peridomicílio, onde predomina *L. whitmani* que já foi incriminada por outros autores (BARRETO, 1943; CARVALHO et al., 1989; CUBA et al., 1982; PESSOA & COUTINHO, 1941; VEXENAT et al., 1986a), como importante vetor de Leishmaniose Tegumentar Americana. Na Bahia, *Lutzomyia whitmani* também é responsável pela transmissão da *Leishmania amazonensis* (NEVES et al., 1995).

Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia

As principais características morfológicas (YOUNG & DUNCAN, 1994) desta espécie são:

- espécie muito semelhante a *L. whitmani*;
- espermoteca com corpo segmentado e cabeça volumosa, com anéis decrescendo da região distal para o duto;
- bomba ejaculadora grande e duto ejaculador com extremidade distal bifurcada, duas a duas vezes e meia o comprimento da bomba.

Nas áreas rurais e periurbanas do Rio de Janeiro e São Paulo, ocorre a presença maciça da *Lutzomyia intermedia*, que tem sido incriminada como o transmissor no peridomicílio e domicílio da

L. braziliensis. O homem tem adquirido a doença, após a devastação das florestas, com drásticas mudanças no meio ambiente.

GOMES (1986), verificou que *L. intermedia* apresenta grande capacidade adaptativa às matas residuais e aos ambientes abertos ou domiciliares, e que as matas residuais seriam importantes, na domiciliação desta espécie. GOMES et al. (1982), no Vale do Ribeira (SP), verificaram o predomínio de *L. intermedia* na primavera e durante o verão. Diversos autores (ARAGÃO, 1975; ARAÚJO FILHO et al., 1981; FORATTINI et al., 1976; GOMES 1979; 1980; 1982; 1983; 1986; RANGEL et al., 1984), verificaram em áreas rurais e periurbanas, nos domicílios e peridomicílios, a predominância de *L. intermedia*, sugerindo uma domiciliação da espécie.

Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei

No Pará (Serra dos Carajás), o vetor da *L. braziliensis* é a *Lutzomyia wellcomei*. O homem adquire a infecção durante o dia, em todo o período estacional das chuvas, de dezembro a maio. A infecção é adquirida quando o homem penetra na mata, uma vez que o vetor não apresenta hábitos domiciliares.

Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis

Ocorre na floresta amazônica no topo das árvores, transmitindo a *L. guyanensis*. O ciclo de transmissão é mantido à noite, entre animais arborícolas e a *L. umbratilis*. No Amapá e Pará, ela aparece como vetor primário (LAINSON & SHAW, 1979). As fêmeas grávidas de *L. umbratilis* descem para a base das árvores para ovipor e migram de volta ao topo para posteriores repastos sangüíneos sobre seus hospedeiros arborícolas. Estas migrações resultam em grandes concentrações de fêmeas sobre a base de árvores de grande porte, particularmente nas primeiras horas do dia, e muitas destas podem estar infectadas. Normalmente, estes flebotomíneos não estão inclinados a

picar o homem, mas quando são perturbados por sua atividade (derrubada de árvores ou simplesmente encostar-se nestas), atacam-no, avidamente.

Lutzomyia (Nyssomyia) anduzei

No Amapá e Pará, esta espécie é considerada como vetor secundário da *L. guyanensis* (LAINSON & SHAW, 1979).

Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata

Esta espécie ocorre, principalmente no Amazonas, Pará e Rondônia, ao nível da base da floresta, como vetor primário da *L. amazonensis*, que, raramente acomete o homem devido a atividade noturna da *L. flaviscutellata* e a pouca atratividade que o homem exerce sobre ela, e está restrita à caçadores e pescadores que penetram na floresta à noite.

Lutzomyia (Nyssomyia) olmeca

Ocorre no Amazonas e Rondônia, como vetor secundário da *Leishmania amazonensis*. Estes vetores são essencialmente noturnos, com pequena capacidade de vôo e habitam até cerca de um metro de altura, nas árvores.

Segundo NEVES et al.(1995), outras espécies são vetores comprovados ou fortemente suspeitos, baseados em isolamentos obtidos de flebotomíneos, naturalmente infectados: *Lutzomyia pessoai* (São Paulo), *Lutzomyia migonei* (Ceará), *Lutzomyia (barretomyia) sp.* (Bahia), *Lutzomyia amazonensis* (Pará), *Lutzomyia chagasi* (Pará), *Lutzomyia hirsuta* (Minas Gerais e Pará), *Lutzomyia paraensis* (Pará) e *Lutzomyia squamiventris* (Pará).

Vários estudos sobre as principais espécies de flebotomíneos, envolvidas na cadeia de transmissão da LTA baseados no encontro de

leishmania nos seus tubos digestivos, demonstraram que existe uma variação das espécies encontradas infectadas de uma região para outra, nos diversos focos da doença no Brasil. ARIAS & FREITAS (1978), dissecaram 6337 fêmeas de flebotomíneos na região de Manaus (AM) e encontraram 16 (0,25%) infectadas por *Leishmania braziliensis*, sendo 12 *Lutzomyia umbratilis* com parasitos localizados nas glândulas salivares, esôfago, estômago posterior e tubos de Malpighi, 1 *Lutzomyia umbratilis* confirmado como positivo após a inoculação em hamster, 2 *Lutzomyia anduzei* com os parasitos localizados em todo o aparelho digestivo e 1 *Lutzomyia anduzei* positivo após a inoculação em hamster. RANGEL et al. (1984), num foco de leishmaniose tegumentar em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, dissecaram 527 exemplares de *Lutzomyia intermedia* e encontraram 1 (0,18%) exemplar naturalmente infectado por *L. braziliensis*, com abundantes promastigotas e paramastigotas no intestino posterior, além de promastigotas livres nos intestinos médio e anterior, pertencem portanto, à Seção Peripylaria, segundo o critério de LAINSON & SHAW(1972) e LAINSON et al.(1977) e que agrupam as espécies e subespécies do complexo *L. braziliensis*. RANGEL et al. (1985), dissecaram 765 flebotomíneos em Além Paraíba, Estado de Minas Gerais (localidade tipo de *Leishmania braziliensis braziliensis*), resultando no isolamento de 1 (0,13%) parasito do complexo *L. braziliensis* encontrado em *Psychodopygus hirsuta hirsuta* naturalmente infectado.

HOCH et al. (1986), na região de Três Braços e Corte de Pedra, examinaram 23.000 flebotomíneos e encontraram 3 exemplares (0,01%) infectados por *Leishmania braziliensis braziliensis*, sendo 2 isolados de *Lutzomyia whitmani* e 1 de *Lutzomyia (Barretomyia) sp*, todos os parasitos se desenvolveram na Seção Peripylaria intestinal dos flebótomos. VEXENAT et al. (1986b), na área de Três Braços (BA), dissecaram 1.832 fêmeas de flebotomíneos de várias espécies e não encontraram infecção natural (0%). RYAN et al. (1990), na área de Três Braços (BA), direcionaram a captura para próximo de uma casa com um

caso humano da infecção recente, dissecaram 193 flebotomíneos e encontraram 1 (0,51%) exemplar positivo.

1.4 Métodos de detecção da infecção natural

1.4.1 Morfológico e Cultivo

Para a detecção da infecção natural dos flebotomíneos por leishmania, o método mais utilizado sempre foi o da dissecação do aparelho digestivo, seguido do semeio em meio de cultura, e/ou inoculação em animais de laboratório. Os flebotomíneos são colocados individualmente sobre lâminas limpas e desengorduradas, em seguida é adicionada uma gota de soro fisiológico, e com o auxílio de estiletos e microscópio entomológico, as asas e patas dos flebótomos são separadas e isoladas da cabeça, tórax e abdômem. Com o emprego de um estilete entomológico, o primeiro segmento torácico é imobilizado e com o auxílio de outro estilete, o último segmento abdominal é tracionado para a retirada do tubo digestivo. Após a dissecação, é colocado uma pequena laminula sobre o material, e no microscópio bacteriológico é realizada a identificação da espécie de flebótomo e a pesquisa de formas promastigotas de leishmania no aparelho digestivo. Detectado o parasito, com o auxílio de uma pipeta, o material é semeado em meio de cultura apropriado, ou pode ser aspirado com uma seringa e inoculado, preferencialmente em hamster. Para o semeio em meio de cultura é recomendado esterilizar todo o material em autoclave, à 121°C por 1 hora, para evitar a contaminação que na maioria das vezes ocorre. O hamster inoculado deve ser mantido em observação por um período mínimo de 6 meses, antes de ser necropsiado.

1.4.2 Biologia Molecular

Recentemente, vem sendo utilizada a técnica de PCR e hibridização do DNA do cinetoplasto, para o diagnóstico da infecção natural de flebotomos por leishmania. A utilização da técnica de PCR, aumenta a sensibilidade na detecção de leishmania porque amplifica seqüência alvo em minicírculos, que posteriormente servem de substrato para reação de hibridização com DNA ou com as sondas já descritas (RODGERS et al., 1990).

A técnica se baseia numa reação polimerásica simples, em que temos o DNA a ser amplificado, oligonucleotídeos que hibridizam com as extremidades deste DNA e em fitas opostas, e deoxinucleotídeos. A reação se inicia com a desnaturação do DNA alvo, que se processa, habitualmente, a 94°C; posteriormente, a mistura é resfriada a uma temperatura de 50°C, etapa em que a depender da seqüência dos primers, ocorrerá pareamento nos lugares em que são complementares. A seguir, a reação é mantida a 72°C, para que a polimerase termoestável possa estender a fita. Com ciclos sucessivos de desnaturações, hibridizações e extensões, pode-se obter uma amplificação teórica de 2^n , onde "n" é o número de ciclos efetuados (MULLIS, 1990; SAIKI et al., 1988; SCHOCHETMAN et al., 1988).

PEREZ et al. (1994), em Chaute, Lima-Peru, localidade endêmica para leishmaniose cutânea, examinaram 5.861 fêmeas de flebotomíneos que foram testadas em 713 amostras, pela técnica do PCR e encontraram 8 (1,1%) amostras positivas. FELICIANGELI et al. (1994), na Venezuela examinou 4.863 fêmeas de flebotomíneos pelo PCR e encontraram 53 naturalmente infectados, sendo, 51 *Lutzomyia ovallesi* e 2 *Lutzomyia gomezi* infectados por promastigotas e a hibridização com sondas de *Leishmania braziliensis* identificou 49 *Lutzomyia ovallesi* (1,0%) e 2 *Lutzomyia gomezi* (0,04%).

2 OBJETIVOS

A grande variabilidade no índice de infecção natural de flebotomíneos por leishmania descrita na literatura, pode ser devida a realização de capturas não direcionadas, e na técnica de dissecação do aparelho digestivo do inseto para o exame entre lâmina e laminula. A nossa hipótese é que, métodos mais precisos/sensíveis de detecção de infecção e direcionamento da captura, para áreas próximas ao relato de casos da doença, podem aumentar a taxa de identificação de flebótomos infectados.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a infecção natural de flebotomíneos, por *Leishmania*, em um foco hiperendêmico de Leishmaniose Tegumentar Americana (Corte de Pedra - Bahia) utilizando-se captura dirigida e reação polimerásica em cadeia (PCR).

2.2 Objetivos específicos

- 1- Direcionar a captura de flebotomíneos, para o domicílio e peridomicílio, de pacientes com diagnóstico recente da doença.
- 2- Utilizar a técnica de reação em cadeia da polimerase (P C R), como método de detecção da infecção natural de flebótomos por leishmania.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área do estudo

Corte de Pedra é um vilarejo pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, distante 280 Km de Salvador, Região Sudoeste do Estado da Bahia, entre 13^o32' latitude Sul e 39^o25' longitude Oeste (Fig. 1). A região é formada por pequenas montanhas, e a altitude varia de 600 a 900 metros. A agricultura predominante é a cultura do cacau, seguida da cultura do cravo, e da criação de pequenos rebanhos de gado bovino. A lavoura de cacau é um excelente habitat para os flebotomíneos.

O clima da região é quente e úmido, com resquícios de florestas do tipo tropical úmido. O índice pluviométrico mensal médio foi de 96,8 mm³, em 1995 e 124,9 mm³ em 1996, com maior concentração das chuvas nos meses de abril a julho e novembro a dezembro em 1995, e fevereiro a julho em 1996 (CEPLAC, 1996)(Gráf. 1).

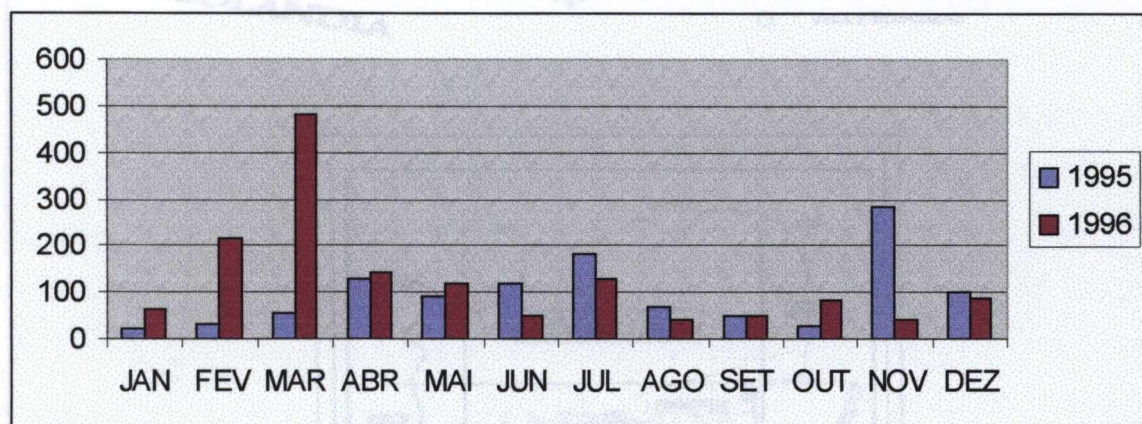


Gráfico 1 - Dados pluviométricos (mm³) de 1995 e 1996.

A região de Corte de Pedra é considerada uma área endêmica de Leishmaniose Cutâneo Mucosa, cujo posto de saúde recebe pacientes procedentes de outros municípios, num raio aproximado de 100 Km, sobretudo dos municípios de Teolândia, Wenceslau Guimarães e Valença.

No período de 1984 a 1997, foram diagnosticados um total de 11.340 casos de Leishmaniose Cutânea no Posto Médico local, com uma média de 463 casos/ano, caracterizando uma área hiperendêmica

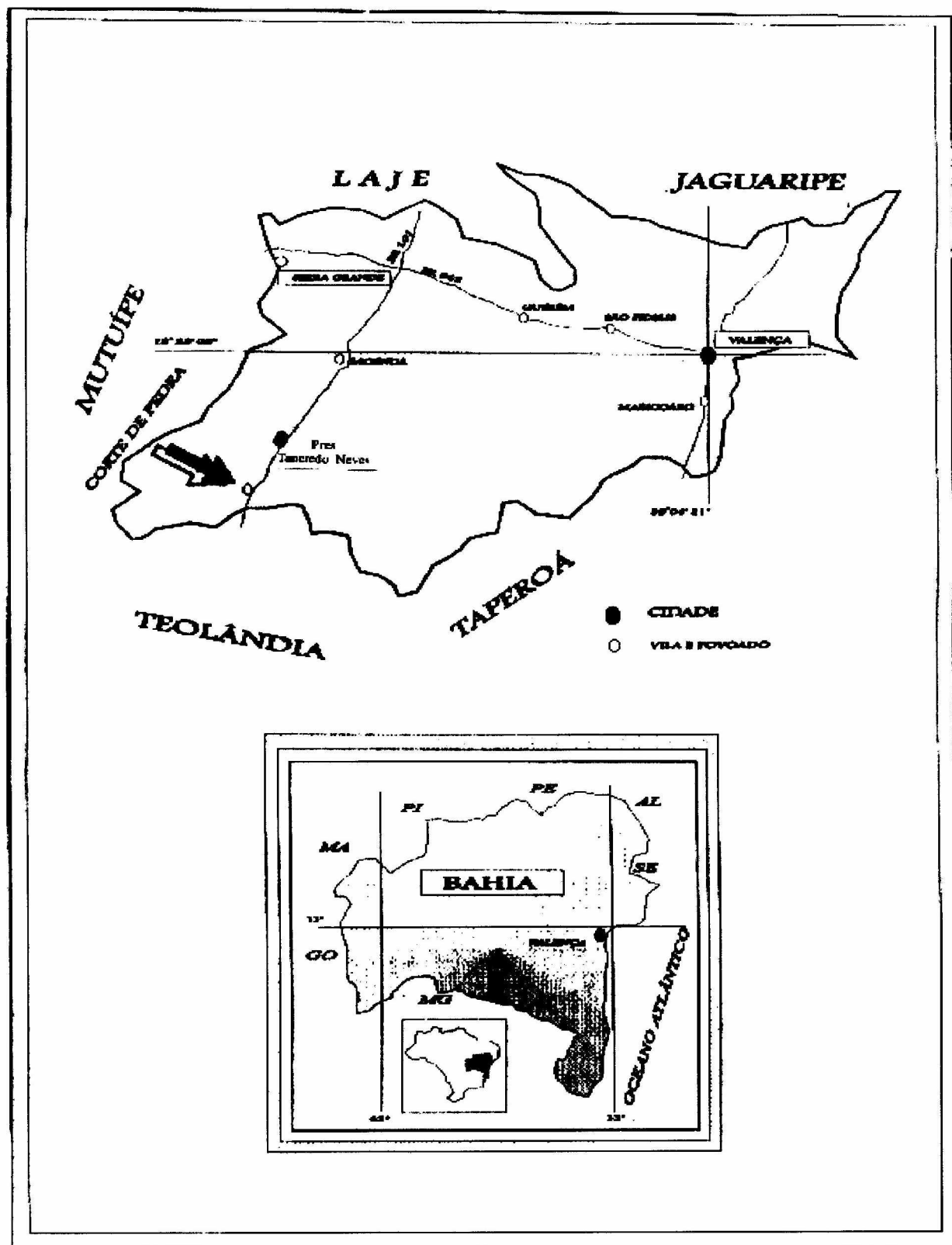


Figura 1 – Localização do município de Presidente Tancredo Neves.

3.2 Coleta de flebotomíneos no campo

Os períodos escolhidos para as capturas dos flebotomíneos eram aqueles em que a equipe composta de médicos pesquisadores do Serviço de Imunologia do Hospital Prof. Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia e do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília, estavam realizando o atendimento ambulatorial no Posto de Saúde, já que nesses períodos, os casos recentes de leishmaniose eram detectados. Após o atendimento, os pacientes eram conduzidos aos seus domicílios, onde era analisada a viabilidade das capturas. Essa viabilidade era observada no mesmo dia e os critérios eram: residir no máximo 100 Km de distancia do posto médico de Corte de Pedra, que as estradas fossem transitáveis em épocas de chuvas e que houvesse acesso de carro até próximo do domicílio dos pacientes.

Foram realizadas capturas noturnas de flebótomos nos peridomicílios. Essas capturas eram iniciadas às 18:00 horas, por tempo indeterminado, dependendo da densidade dos flebotomíneos, sendo utilizada a armadilha de pano tipo **“Shannon” modificada** (Fig. 2), associada ao **capturador manual de aspiração** (SHANNON, 1939) (Fig. 3). A armadilha era colocada a uma distância máxima de 20 metros da casa do paciente, dependendo do local disponível em que a mesma pudesse ser amarrada. Na maioria das vezes, eram amarradas em cacauzeiros, craveiros, coqueiros, bananeiras e outras árvores suspeitas de atraírem os flebotomíneos. Quando não existiam árvores, a armadilha era amarrada em uma parte da casa e o outro lado prendia-se à madeiras improvisadas. Houve uma certa preferência de colocar a armadilha próxima a galinheiros ou abrigos de animais domésticos como cães, porcos, bovinos, caprinos, e equídeos. Os locais escolhidos também eram aqueles que apresentavam a menor interferência possível de ventos e fumaças. A coleta era realizada com o capturador manual de aspiração nas paredes externas e internas da armadilha Shannon, e no interior da armadilha era colocado um lampião a gás, como isca luminosa.



tornam muito pesadas e preferem os locais mais baixos, para se

FIGURA 2 - Armadilha Shannon modificada



3.4. Obtenção de flebotomíneos em laboratório

FIGURA 3 - Capturador manual de aspiração

Para a padronização das técnicas de PCR, houve a necessidade de manter um padrão de captura de flebotomíneos em laboratório. Logo após a captura peridomiciliar, era realizada a coleta domiciliar, onde eram vistoriados os quartos, sala, cozinha, banheiros e outras dependências. A duração dependia da densidade de flebotomíneos e era realizada apenas com o capturador manual de aspiração e lanterna manual à pilha. A vistoria das paredes era realizada até uma altura de no máximo 2 metros, uma vez que, as espécies que frequentam o domicílio, normalmente não ultrapassam essa altura. Quando em alguma dependência da casa haviam pessoas repousando, a vistoria era concentrada também no piso da casa, próximo as paredes, pois ocorria a possibilidade do encontro de fêmeas ingurgitadas de sangue que se tornam muito pesadas e preferem os locais mais baixos, para se abrigarem.

3.3 Acondicionamento dos flebotomíneos

Após as capturas peridomiciliares e domiciliares, os flebotomíneos coletados para o diagnóstico da infecção natural, eram colocados em pequenas gaiolas e transportados para o laboratório do Posto Médico, em Corte de Pedra, onde eram mantidos no freezer, até a morte. Em seguida, os flebotomíneos eram transferidos para cápsulas de porcelana, onde os exemplares fêmeas eram selecionados e colocados em criotubos “Nunc” em grupos de 10 ou 20 flebotomíneos, e então eram criopreservados e transportados para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA, onde eram conservados a -70°C até a sua utilização. Os exemplares machos eram estocados em álcool 70%, para posterior estudo taxônomico no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências da Saúde - UFBA.

3.4 Obtenção de flebotomíneos em laboratório

Para a padronização das técnicas de PCR, houve a necessidade de manter uma colônia de flebótomos criados em laboratório. Inicialmente foram realizadas várias capturas de flebotomíneos, que foram alimentados em hamsters saudáveis, para a obtenção de ovos. Essas capturas eram realizadas em locais com maior densidade de flebótomos, como o peridomicílio de uma casa na Fazenda Toca da Onça (Fig. 4). No próprio local da captura, o hamster era anestesiado com Pentobarbital sódico e usado para alimentar os flebótomos capturados, então, no laboratório do Posto Médico, as fêmeas eram transferidas para recipientes apropriados para desova. Estes recipientes continham uma camada de gesso na base, que era devidamente umedecida com a finalidade de proporcionar um ambiente favorável à desova. Na parte superior do recipiente era colocado um pequeno pedaço de algodão embebido em uma solução de 50% de glucose de milho, com a finalidade de proporcionar a alimentação destas fêmeas e também o amadurecimento dos seus ovários, visando um melhor rendimento na postura. Em cada

frasco, eram colocadas 100 fêmeas e 20 machos. As fêmeas alimentadas eram acondicionadas em caixas de isopor, onde eram colocados chumaços de algodão embebidos em água, com a finalidade de manter um ambiente com alto índice de umidade relativa do ar. Dessa maneira, os flebótomos para desova eram transportados para o Laboratório de Parasitologia da UFBA.



FIGURA 4 – Domicílio e peridomicílio com alta densidade de flebotomíneos

3.5 Criação de *Lutzomyia whitmani* em laboratório.

No Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, realizamos a manutenção de uma colônia de *Lutzomyia whitmani*, criados em laboratório até a primeira geração, com a finalidade de padronizar a técnica de PCR.

Os flebotomíneos capturados no campo, chegavam em recipientes plásticos cilíndricos, transparentes, medindo 8 cm de altura por 12 cm de

diâmetro, e tendo como base uma preparação de gesso em água destilada. Estes frascos tinham, na parte superior, um tecido tipo “voil” com um orifício central, que era vedado por um pedaço de algodão, e que permitia o acesso de estiletes, pincéis e capturadores, no seu interior. Nesses recipientes, geralmente, contendo 100 exemplares fêmeas e 20 machos, ocorriam a postura dos ovos que eram depositados pelas fêmeas, nas suas paredes, no algodão e em maior parte, no gesso.

Os ovos depositados nas paredes dos frascos e no gesso foram retirados um a um, utilizando um pincel fino umedecido em água destilada, e transferidos para placas de Petri, contendo água destilada. Os ovos que ficavam retidos no algodão eram retirados, submergindo o algodão numa placa de Petri, com água destilada, para tornar mais fácil a sua manipulação. Em seguida, os ovos contidos na placa de Petri com água destilada eram colocados em um novo recipiente plástico, com gesso na base, onde era feita a manutenção das formas imaturas. Em cada recipiente foi colocado cerca de mais ou menos 500 ovos.

No novo recipiente, controlamos a umidade do gesso que é essencial para que ocorra a maturação dos ovos. Este controle foi feito colocando embaixo do recipiente com gesso, uma placa de Petri com água destilada e com auxílio da lupa entomológica era observada a absorção da água pelo gesso, até que ocorresse o umedecimento da superfície do gesso e dos ovos. Com a umidade excessiva, os ovos ficavam cobertos com uma película aquosa que impedia a eclosão ou eclodiam, e as larvas morriam com o excesso de água. Nesta situação, era substituída a placa de Petri com água destilada que estava sob o recipiente de gesso por uma folha de papel toalha que retirava o excesso de umidade do gesso. Havendo por sua vez uma umidade escassa, os ovos paravam de eclodir e as larvas morriam.

Os recipientes contendo os ovos, eram acondicionados em caixas de isopor. Após mais ou menos cinco dias, os ovos eclodiam, dando origem às larvas de primeiro estágio que eram alimentadas com ração

autoclavada para evitar a proliferação de fungos. A ração utilizada foi uma mistura de fezes de coelho, alfaca, pó de xaxim e terra vegetal, na proporção de 1:1:1:1.

Agentes prejudiciais às culturas eram os ácaros e fungos que invadiam as colônias. No Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, estes fungos foram identificados como *Aspergillus niger*, e o combate foi mecânico, utilizando-se um estile para remove-los, diariamente. A exterminação dos ácaros também foi mecânica, com um estilete realizando a destruição um a um.

Os flebótomos adultos criados em laboratório foram diretamente utilizados para os testes de padronização da técnica de PCR, ou então, alimentados com uma solução de glucose de milho a 50%, através de um pequeno algodão embebido nesta solução e colocado externamente ao frasco, sobre o “voil”. Após o segundo dia, o flebótomo adulto podia ser colocado para realizar o repasto sangüíneo, em hamster sadio anestesiado com Pentobarbital Sódico. Mais ou menos duas horas antes do repasto sangüíneo, era retirada a solução açucarada, e os flebótomos transferidos para uma gaiola de acrílico, coberta por um tecido de cor preta, para deixar o ambiente escuro. As fêmeas que realizavam a alimentação sangüínea, eram transferidas para um novo recipiente plástico para postura, obtendo-se assim, *L. whitmani* cultivados em laboratório.

3.6 Identificação dos flebotomíneos

Para a identificação taxônomica, foi realizada a montagem dos exemplares machos em bálsamo do Canadá, utilizando-se a técnica descrita a seguir: álcool a 70% (acondicionados no campo); hidróxido de potássio a 10%, durante 24 horas; ácido acético a 10%, durante 20 minutos; 3 séries de água destilada com duração de 15 minutos cada série; álcool a 70%, durante 20 minutos; álcool a 90% , durante 15 minutos; álcool absoluto, durante 15 minutos e creosoto de Faya durante

24 horas. Em seguida, os flebotomíneos eram retirados da cápsula de porcelana com o auxílio de um estilete entomológico e colocados sobre lâminas, com uma pequena gota de creosoto de Faya.

Já sobre a lâmina, na posição lateral era realizado um pequeno corte entre o tórax e a cabeça para que essa última sofresse um pequeno giro e permanecesse na posição dorsal, a fim de serem visualizados os caracteres dos palpos e das antenas. Em seguida, retirado o excesso do creosoto com um papel de filtro, acrescentado o bálsamo do Canadá, e uma pequena lamínula. A identificação das espécies foi realizada de acordo com a classificação utilizada por YOUNG & DUNCAN (1994). Foram levados em consideração caracteres morfológicos como coloração, tamanho do inseto, medidas dos segmentos dos palpos, ascóides das antenas, cerdas e espinhos do aparelho reprodutor masculino e das patas, além de outros caracteres específicos para cada espécie.

3.7 Extração de DNA dos flebótomos

O DNA total a ser usado no PCR foi extraído de amostras contendo 10 ou 20 fêmeas de flebótomos, usando 40ul de reagente de lise (10mM Tris-HCl pH 9.2; 10mM EDTA e 100ug/ml de Proteinase K) para amostras com 10 flebótomos e 80ul para aquelas com 20 flebótomos. As amostras foram incubadas com esses reagentes por 2 a 3 horas a 56°C, com agitação periódica, centrifugadas a 12.000 RPM, 4°C, por 15 minutos, e o sobrenadante coletado e aquecido a 95°C, por 15 minutos, para a inativação da Proteinase K (Gibco). As amostras foram então novamente centrifugadas, sob as mesmas condições por 40 segundos e o sobrenadante estocado a -20°C até seu emprego no PCR (PEREZ et. al, 1994).

3.8 Amplificação da região constante de minicírculos de *k*DNA por PCR

Para amplificação da região conservada do minicírculo do *k*DNA foram usados o primer direto 150 (5' GGG-G/TAG-GGG-CTG-TCT-GCG-AA 3') e uma mistura dos primers reversos 152A (5' GGC-CCA-CTA-TAT-ACC-AAC-CCC 3') e 152B (5' CCG-CCC-CTA-TTT-TAT-ACC-ACC-AAC-CCC 3'). Cada reação apresentou volume final de 50ul contendo: tampão Tris-HCl 10mM pH 9.2; KCl 75mM; MgCl₂ 1,5mM; 100ug/ml de BSA (Sigma); 0,2mM de cada dNTP (Pharmacia); 0,5 pmoles do primer 150; 0,5pMOL da mistura contendo 0,25pMOL do primer 152A e 0,25 pmoles do primer 152B; 2,5 Unidades de *Taq* DNA polimerase (Perkin Elmer); H₂O (água ultra pura sterile para Biologia Molecular, livre de pirógenos e Rnase ; Biotecx) e 5ul de amostra de DNA extraído de flebotomos. Para a ciclagem térmica das amostras, foi usado o aparelho Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corporation 9600), programado para 35 ciclos, cada um com 30 segundos a 94°C, para a desnaturação, 30 segundos a 50°C, para o pareamento de primers e DNA alvo, e 30 segundos 72°C, para a extensão. O programa acima foi precedido de um ciclo de 4 minutos a 94°C e seguido de outro de 10 minutos a 72°C (MULLIS, 1990; SAIKI et al., 1988; SCHOCHETMAN et al., 1988).

3.9 Análise eletroforética de PCR e confirmação da identidade dos amplicons por Dot-blot

Alíquotas de 12ul das amostras de PCR, foram adicionadas a 3ul de tampão de carga (0,25% [vol/vol] azul de bromofenol, 0,25% [vol/vol] xilenocianol em 40% de solução aquosa de sacarose), e fracionadas por Eletroforese em Gel de Agarose a 2% (ultrapure, Gibco, BRL), com tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato e 1mM de EDTA pH 8.0) durante 1 hora a 80 Volts. Na corrida foi utilizado o marcador de peso molecular 100bp ladder (Pharmacia) para a averiguação do peso molecular dos amplicons. A fotografia dos géis corados com brometo de

etídio foi realizada em transiluminador (IBI, UVT 400) a uma UV de 312nm de comprimento de onda, usando uma câmara Kodak (IBI, 46400) e filme Polaroid 667, ISO 3000 (Polaroid Co., MA/USA)

A confirmação da intensidade dos amplicons foi realizada com Dot-blot, tendo sido usadas duas sondas de DNA: (Sonda 1) fragmento da região constante do minicírculo de *Leishmania (Viannia) panamensis*, IPAN V, número de acesso no Gene Bank U19811; e (Sonda 2) fragmento da região constante do minicírculo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, MHOM/BR/73 M2269, número de acesso no Gene Bank U198/0 (FERNANDES et. al, 1996). As sondas de DNA foram marcadas radioativamente pela técnica de iniciadores randômicos, Random Hexamer Primer (FEIMBERG & VOGELSTEIN, 1983), por incorporação de d-ATP acoplado ao isótopo radiativo alfa 32P e, então foram purificadas por cromatografia em colunas P-10 (Bio Rad).

Para o preparo das membranas, os produtos amplificados (20ul) foram desnaturados por incubação com 20ul de solução NaOH 0,4N, 0,25ul EDTA e 160ul de H₂O, por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, o volume total do DNA desnaturado foi aplicado em uma membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) pré-tratada por 10 minutos, a temperatura ambiente (TA) com solução de SSC 0,1X, montada num aparelho Hybri dot (Gibco-life technologies). Após a aplicação das amostras, a membrana foi seca a 80°C por 2 horas em forno a vácuo (VWR) e tratadas por 1 minuto, sob luz ultravioleta num aparelho Stratalinker (Stratagen). Em seguida, a membrana foi incubada a 60°C em BLOTTO por 2 horas, sendo acrescentada a sonda purificada. A hibridização foi realizada em BLOTTO à mesma temperatura durante a noite. Ao final do período de hibridização as membranas foram lavadas em SSC 0,5X/SDS 0,1% a 60°C e usadas para expor filmes de RX (KODAK – XOMAT), a -70°C, durante a noite, com placa intensificadora de sinal.

4 RESULTADOS

4.1 A coleta de flebotomíneos.

As capturas foram selecionadas a partir de 45 pacientes, onde foram coletados 5.269 flebotomíneos, sendo 4.027 exemplares fêmeas e 1.242 machos. Foram realizadas 79 capturas, sendo 43 no peridomicílio, e 36 no domicílio. As capturas realizadas no peridomicílio receberam uma numeração antecedida pela letra “P” e as realizadas no domicílio antecedida da letra “D”. Os resultados mostraram o baixo índice de flebotomíneos no domicílio, que pode ser explicado pelo fato de na região predominar a espécie *Lutzomyia whitmani*, que freqüenta pouco o domicílio e tem grande avidez para picar o homem e os animais domésticos, no peridomicílio (Tabela 1).

TABELA 1 – Captura de flebotomíneos (fêmeas) no domicílio e peridomicílio de 45 pacientes

	Nº de capturas	Nº de horas trabalhadas	Nº de flebótomos coletados	% de flebótomos coletados
Peridomicílio	43	55	4007	99,5
Domicílio	36	7	20	0,5
TOTAL	79	62	4027	100

Foram capturados 1.242 flebotomíneos machos, sendo 1.231 no peridomicílio e 11 no domicílio. Houve a predominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* no domicílio e peridomicílio, seguido por *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. Foi observado o predomínio de *L. whitmani* no peridomicílio e domicílio, respectivamente 92,8% e 63,7%, e em menor frequência *L. intermedia* no domicílio (36,3%) e peridomicílio (6,9%). Em um pequeno número de flebótomos foi possível identificar apenas o gênero e sub-gênero por estarem danificados. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. A finalidade foi obter um conhecimento aproximado da fauna flebotomínica nos locais das capturas, uma vez que, as fêmeas não foram identificadas.

TABELA 2 - Flebotomíneos machos capturados no domicílio e peridomicílio

ESPÉCIE	Nº flebótomos no domicílio	%	Nº flebótomos no peridomicílio	%
<i>Lutzomyia(N)whitmani</i>	7	63,7	1142	92,8
<i>Lutzomyia(N)intermedia</i>	4	36,3	85	6,9
<i>Lutzomyia(Nyssomyia)sp</i>	-	-	4	0,3
TOTAL	11	100	1231	100

4.2 As amostras para diagnóstico pelo PCR

No período de setembro de 1995 a março de 1996, foram coletadas no peridomicílio e domicílio de pacientes com infecção recente, um total de 335 amostras sendo 236 grupos contendo no máximo 10 flebótomos

cada e 99 grupos contendo no máximo 20 flebótomos cada (alguns grupos continham menos de 10 ou 20 flebótomos (Tabela 3).

TABELA 3 - Número de amostras coletadas e a data da captura.

MÊS/ANO	Grupos de 20 flebótomos	Grupos de 10 flebótomos	TOTAL
09 / 95	38	-	38
10 / 95	61	-	61
11 / 95	-	156	156
02 / 96	-	40	40
03 / 96	-	40	40
TOTAL	99	236	335

Das 79 capturas realizadas, 50 foram positivas para a coleta de flebótomos e os pacientes eram procedentes de 22 localidades diferentes (Tabela 4), sendo que foi observado um maior número de flebotomíneos na localidade Riachão das Touceiras e Julião, e um maior número de pacientes da localidade Julião e Tesoura 1. Quando comparamos o número de pacientes no mês da coleta, no mês anterior e posterior à coleta, não foi possível estabelecer relações (Tabela 5).

TABELA 4 - Data da captura, localidade e número da amostra

DATA DA CAPTURA	LOCALIDADE	No AMOSTRA
09/95	Km 85	17, 20
09/95	JULIÃO	21,34
09/95	TESOURA 1	1,8,12,13,16,25,33,35,36,38
09/95	TESOURA 1	27
09/95	JULIÃO	4,5,9,14,18,19,23,28,29,30,31
09/95	LIMOEIRO 2	11
09/95	TESOURA 1	2,3,6,10,15,22,24,26,32,37
09/95	TESOURA 2	7
10/95	IPIRANGA	91
10/95	PAÓ	92,93,94,95,96
10/95	PEDRA	82,83,84,85,97,98,99
10/95	PEDRA	86
10/95	PAÓ	87
10/95	PEDRA	88,89
10/95	TESOURA 1	73,90
10/95	JULIÃO	39,40,41,42,43,46,47,48,49,51,52,53,54,55,56 57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71 72,74,75,76,77,78,79,80,81
10/95	VILA SÃO LUIZ	44,50
10/95	TABULEIRO	45
11/95	PIAU	100
11/95	PERIFERIA (PTN)	101,102
11/95	RIACHÃO DAS TOUCEIRAS	131,132,133,134,135,136,137,138,168,169 170,171,172,173,174,175,176,177,178,179 180,181,182,183,184,185,186,187,188,189 190,191,192,193,194,195,196,197,198,243 244,245,246,247,248,249,250,251,252,253 254,255
11/95	JULIÃO	103
11/95	JULIÃO	104
11/95	RIACHÃO DAS TOUCEIRAS	199,200,201,202,203,204,205,206,207,208 209,210,211,212,213,214,215,216,217,218 219,220,221,222,223,224,225,226,227,228 229,230,231,232,233,234,235,236,237,238 239,240,241,242
11/95	TANQUE GRANDE	105,106,107,108,109,110,111,112,113,114 115,116,117,118,119,120,121,122,123,124
11/95	TABULEIRO	125,126,127,128,129,130,151
11/95	Km 100	139,140,141,142,143,144,145,146,147,148 149,150,152,153,154,155,156,157,158,159 160,161,162,163,164,165,166,167
02/96	TABULEIRO	256,257,258,259,260,261,262,263,264,265 266,267,268,269,270,271,272,273,274
02/96	TABULEIRO	275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,303
02/96	TABULEIRO	285,286,287,288,289,290,291,292
02/96	LAMA	293
02/96	LAMA	294
03/96	LAMA	295,296,297,298
03/96	LAMA	299,300,301,302,304
03/96	TANQUE GRANDE	305
03/96	TANQUE GRANDE	306
03/96	TABULEIRO DE ITABAINA	307

03/96	CABECEIRA DO MAIA	308
03/96	VÁRZEA	309
03/96	VÁRZEA	310
03/96	BATATEIRAS	311,312,313
03/96	Km 100	314,315
03/96	Km 100	316
03/96	VÁRZEA	317,318,319,320
03/96	VÁRZEA	321
03/96	VÁRZEA	322,323,324
03/96	VÁRZEA	325
03/96	JULIÃO	326,327,328,329,330
03/96	ÁGUAS CLARAS	331,332,333,334
03/96	BAIXINHA	335

TABELA 5 - Localidades com flebotomíneos coletados, pacientes e população

LOCALIDADE MUNICÍPIO	No. GRUPOS COLE- TADOS	No. PACIENTES NO MES DA COLETA	No. PACIENTES NO MÊS ANTERIOR	No PACIENTES NO MÊS POSTERIOR	POPU- LAÇÃO
km 85 - TE	2	1	-	-	50
JULIÃO - PTN	58	10	5	6	300
TESOURA 1 - PTN	23	4	3	-	110
LIMOEIRO - TE	1	3	-	1	220
TESOURA 2 - PTN	1	1	-	-	80
PAU DA LETRA-PTN	1	1	-	-	80
IPIRANGA - PTN	1	1	-	-	60
PAÓ - PTN	6	2	-	-	315
PEDRA - PTN	10	2	2	-	180
VILA S. LUIZ - WG	2	1	-	-	60
TABULEIRO DA					
SERRA DO SAL-PTN	2	2	1	-	250
PIAU - PTN	1	1	-	-	70
PERIFERIA - PTN	2	2	-	-	1200
RIACHÃO DAS					
TOUCEIRAS - PTN	96	1	-	-	110
TANQUE GRANDE-TE	22	3	-	2	150
TABULEIRO DE					
SILVINO - PTN	45	2	-	-	80
Km 100 - WG	31	2	-	-	300
LAMA - WG	11	2	1	-	60
CABECEIRA MAIA-PTN	1	1	-	-	60
VÁRZEA - VA	11	1	1	-	250
BATATEIRA - TE	3	1	-	-	120
AGUAS CLARAS - TE	4	1	-	1	160
BAIXINHA - TE	1	1	1	-	140
TOTAL	335	45	12	9	4405

4.3 Padronização do PCR para detecção de *Leishmania braziliensis* em flebotomos

A presença de leishmania nos flebotomos capturados na zona endêmica foi analisada por PCR, usando-se primers específicos para a região conservada do minicírculo de DNA mitocondrial do parasito. No processo de padronização da técnica, amostras de 10 e 20 flebotomíneos, vindos da colônia de laboratório, foram misturados com ZERO, 10, 100 e 1000 leishmanias e o DNA total foi extraído e submetido à amplificação conforme descrito em materiais e métodos. Nesse processo, também foram testados tampões com diferentes pHs (Tris – HCl 10mM, pH: 8.3, 8.8 e 9.2) e diferentes concentrações dos seus constituintes (MgCl₂ 1,5mM e 3,5m M; KCl 25mM e 75mM). O melhor resultado foi obtido na reação contendo: Tris–HCl 10mM, pH 9.2; MgCl₂ 1,5mM; KCl 75mM e 100ug/ml de BSA(Sigma); 0,2mM de cada dNTP; 0,5pmol do primer 150; 0,5pmol da mistura contendo 0,25pmol do primer 152 A e 0,25pmol do primer 152 B; 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Perkin Elmer); H₂O para completar o volume final e 2ul do DNA extraído de flebotomos. Foram realizados 35 ciclos de 94^o C por 30” para a desnaturação; 50^o C por 30” para o pareamento dos primers às seqüências alvos e 72^o C por 30” para a extensão; uma etapa inicial de desnaturação 94^o C por 4’ e uma final de 72^o C por 10’. Para evitar a ocorrência de auto hibridização e amplificação dos primers, foi realizado hot start PCR. Os produtos destas reações foram fracionados em gel de agarose a 2% e os resultados ótimos estão dispostos na Fig. 5. Como controle positivo para a detecção e caracterização da espécie de leishmania, foram utilizados flebotomos infectados em laboratório por *L. braziliensis*, em hamster. Como controle negativo, foram utilizados flebotomíneos criados em laboratório de uma colônia procedente da região em estudo (Fig. 6).

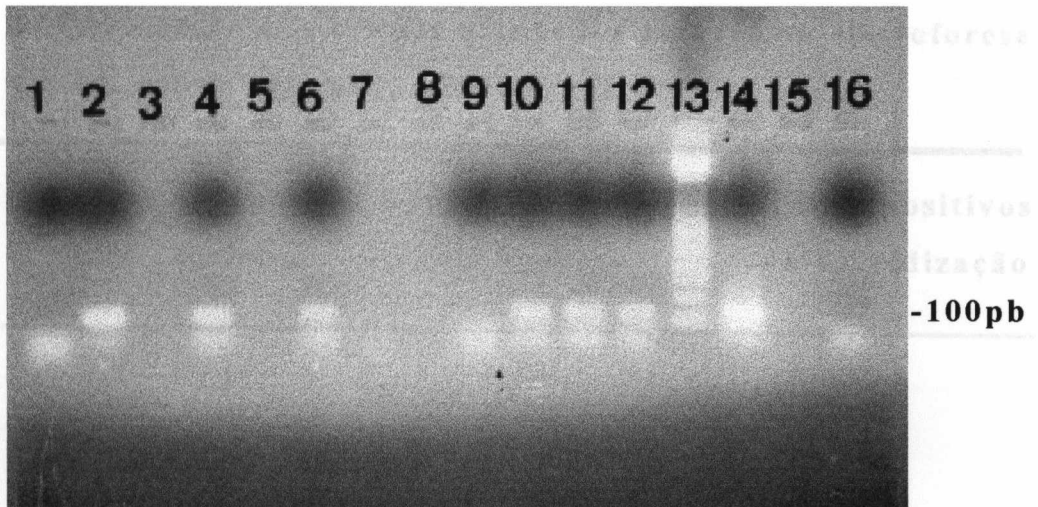


FIGURA 5 – Avaliação da sensibilidade do teste PCR

Linha 1 – 10 flebótomos + ZERO *Leishmania*

Linha 2 - 10 flebótomos + 1000 *Leishmania*

Linha 4 - 10 flebótomos + 100 *Leishmania*

Linha 6 - 10 flebótomos + 10 *Leishmania*

Linha 9 - 20 flebótomos + ZERO *Leishmania*

Linha 10 - 20 flebótomos + 1000 *Leishmania*

Linha 11 - 20 flebótomos + 100 *Leishmania*

Linha 12 - 20 flebótomos + 10 *Leishmania*

Linha 13 - marcador - 100 pares de base(pb)

Linha 14 - controle positivo - cultura de *Leishmania*

Linha 16 - controle negativo - água

4.4 Detecção de *L. braziliensis* em amostras de flebótomos por PCR e Dot-Blot.

Das 335 amostras de flebótomos testadas para detecção de leishmania por PCR, 11 (0,74%) foram positivas à observação em gel e 30(8,95%) foram positivas ao Dot-Blot, com sonda específica para *Leishmania braziliensis* (Tabela 6).

TABELA 6 – Avaliação dos grupos utilizados através da eletroforese em gel de agarose e hibridização

MÊS/ANO	Grupos testados	Grupos positivos em agarose	Grupos positivos na hibridização
09 / 95	38	10	25
10 / 95	61	-	-
11 / 95	156	1	1
02 / 96	40	-	-
03 / 96	40	-	4
TOTAL	335	11	30

Na Fig. 6 são visualizadas amostras positivas em gel e na Fig. 10 exemplo de Dot-Blot. É importante notar que, 328 amostras estão relacionadas com capturas no peridomicílio e apenas 7 no domicílio, entretanto, 2 das capturas realizadas no domicílio foram positivas ao Dot-Blot (D-105, amostra 27 e D-189, amostra 310), indicando que a transmissão da doença também ocorre no domicílio apesar do reduzido número de flebotomíneos coletados nesse ambiente (Tabela 7). Além do mais, na captura D-105, 20% dos exemplares machos identificados eram *Lutzomyia intermedia*, apesar do predomínio de *Lutzomyia whitmani*. Algumas capturas tiveram mais de uma amostra positiva, totalizando 30 amostras positivas.

TABELA 7 - Flebotomíneos positivos pelo PCR no domicílio e peridomicílio

	Número de grupos examinados	Número de grupos positivos em gel de agarose	Número de grupos positivos na hibridização
Peridomicílio	328	11	28
Domicílio	7	-	2
TOTAL	335	11	30

Das 22 localidades em que residiam os 45 pacientes, 8 acusaram a presença de flebotomos infectados com *Leishmania*, sendo o maior número de capturas em 1 localidade. As outras localidades apresentaram 1 captura cada uma. Destas, 10 foram no período de 1995 a 1997. Destas, 105 foram re-colhidas em 1998. Destes, 10 flebotomos infectados com *Leishmania*.

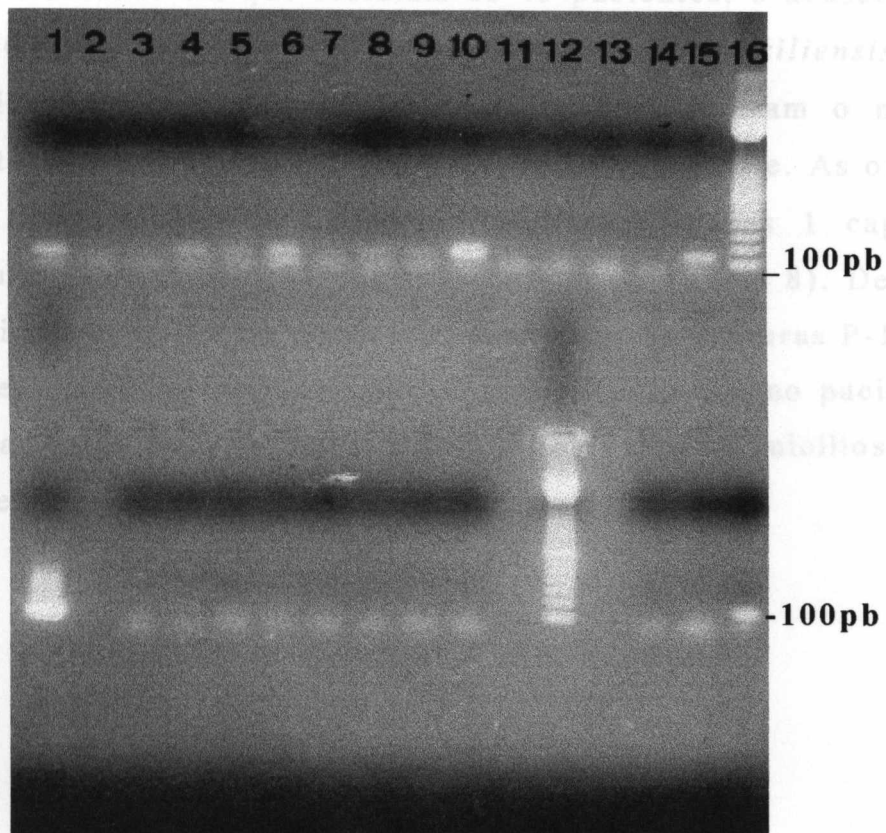


FIGURA 6 – Amostras em gel de agarose

A

1,4,5,6,7,8,9,10 - amostras positivas

2,3,11,12 - amostras negativas

13 - controle negativo - flebotomos não infectados

14 - controle negativo com água

15 - controle positivo - flebotomos infectados com *Leishmania*

16 - marcador - 100 pares de base (pb)

B

1- controle positivo - cultura de *Leishmania*

5- amostra positiva

3,4,6,7,8,9,10 - amostras negativas

Das 22 localidades em que residiam os 45 pacientes, 8 acusaram a presença de flebotomíneos infectados por *Leishmania braziliensis*, ao Dot-blot. As localidades, **Tesoura 1** e **Julião**, apresentaram o maior número de capturas positivas, 3 e 2 capturas, respectivamente. As outras 6 localidades com capturas positivas apresentaram apenas 1 captura positiva cada uma, totalizando 11 capturas positivas (Tabela 8). Destas, 9 foram no peridomicílio e 2 no domicílio, sendo que as capturas P-104 e D-105 foram realizadas no peridomicílio e domicílio do mesmo paciente. Portanto, 10 pacientes tiveram os seus domicílios ou peridomicílios com flebótomos infectados por leishmania.

TABELA 8 - Localidades que apresentaram capturas positivas pela hibridização, o número da captura e o número das amostras(*)

Localidade	Número da captura	Número das amostras
Tesoura 1	P-104	1,8,13,33,35
Tesoura 1	D-105	27
Tesoura 1	P-110	2,3,6,10,15,26,32,37
Pau da letra	P-102	34
Julião	P-106	4,5,9,14,28,29,30,31
Julião	P-198	326,328
Limoeiro 2	P-108	11
Tesoura 2	P-112	7
Tanque Grande	P-144	110
Cabeceira do Maia	P-186	308
Várzea	D-189	310

(*) Pertencem ao município de Presidente Tancredo Neves as localidades: Tesoura 1, Julião, Tesoura 2 e Cabeceira do Maia (Fig. 7), ao município de Teolândia pertencem: Limoeiro e Tanque Grande (Fig. 8), e ao município de Valença pertence a localidade Várzea, representada no Fig. 7, por ser próxima a divisa do município de Pres. Tancredo Neves. O município de Wenceslau Guimarães, não apresentou localidades com flebotomíneos positivos (Fig. 9).

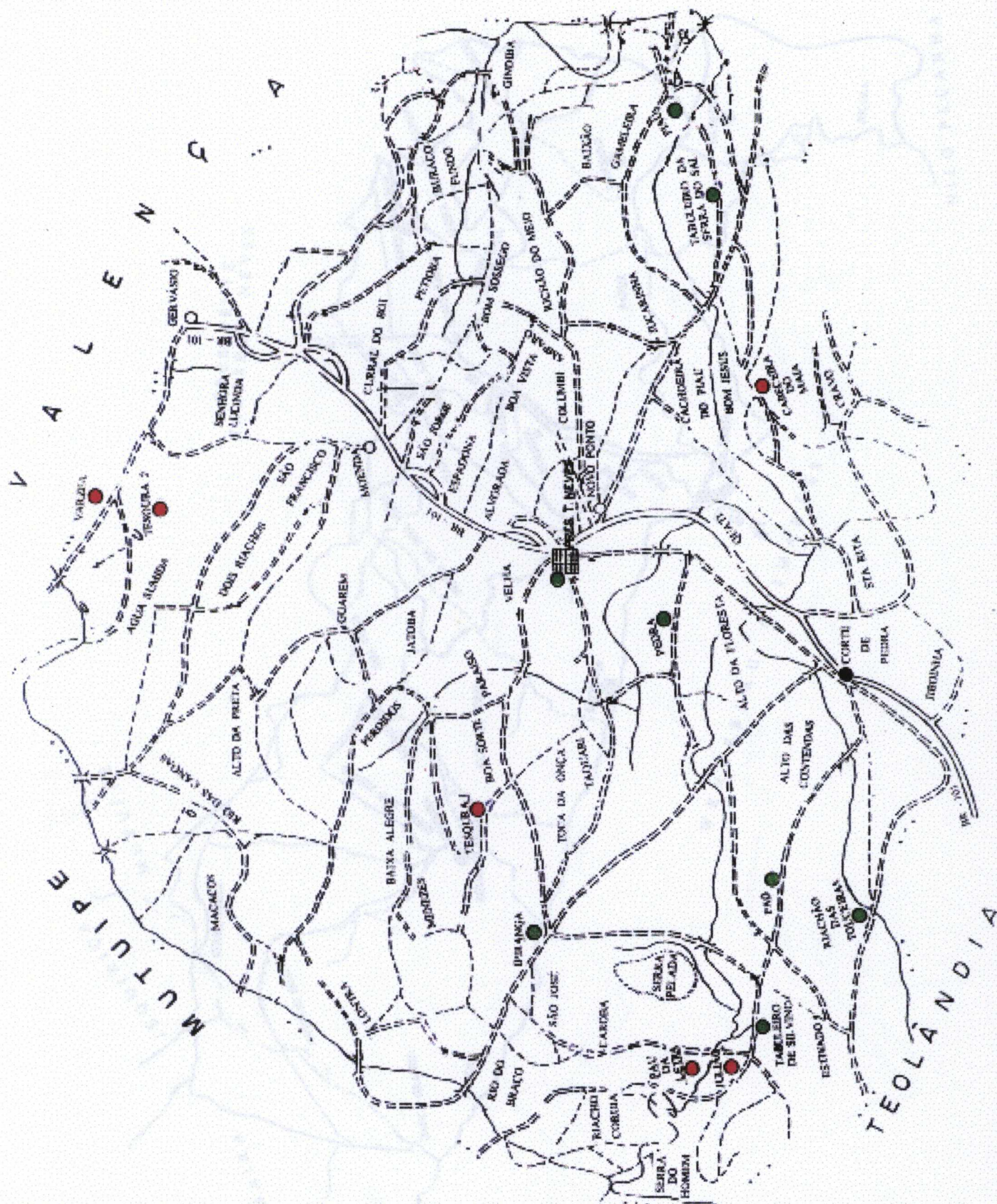


Figura 7. Localidades em que foram coletados flebotomíneos (●) e localidades com capturas positivas (●) no município de Presidente Tancredo Neves.

Em relação aos municípios envolvidos neste estudo, foi observado que a maioria dos pacientes procederam do município de Presidente Tancredo Neves, assim como, o número de flebotomíneos coletados e positivos. O município de Valença, apesar de apresentar o menor número de pacientes e de flebotomíneos, apresentou flebótomo positivo (Tabela 9).

TABELA 9 - Positividade de flebotomíneos relacionada com o Município.

MUNICÍPIO	No. Pacientes no mês da coleta	No. grupos flebótomos coletados	No. grupos flebótomos positivos	%grupos flebótomos positivos
Pres. T. Neves	29	247	27	10,9
Teolândia	10	33	2	6,0
W. Guimarães	5	44	-	-
Valença	1	11	1	9,0
TOTAL	45	335	30	8,95

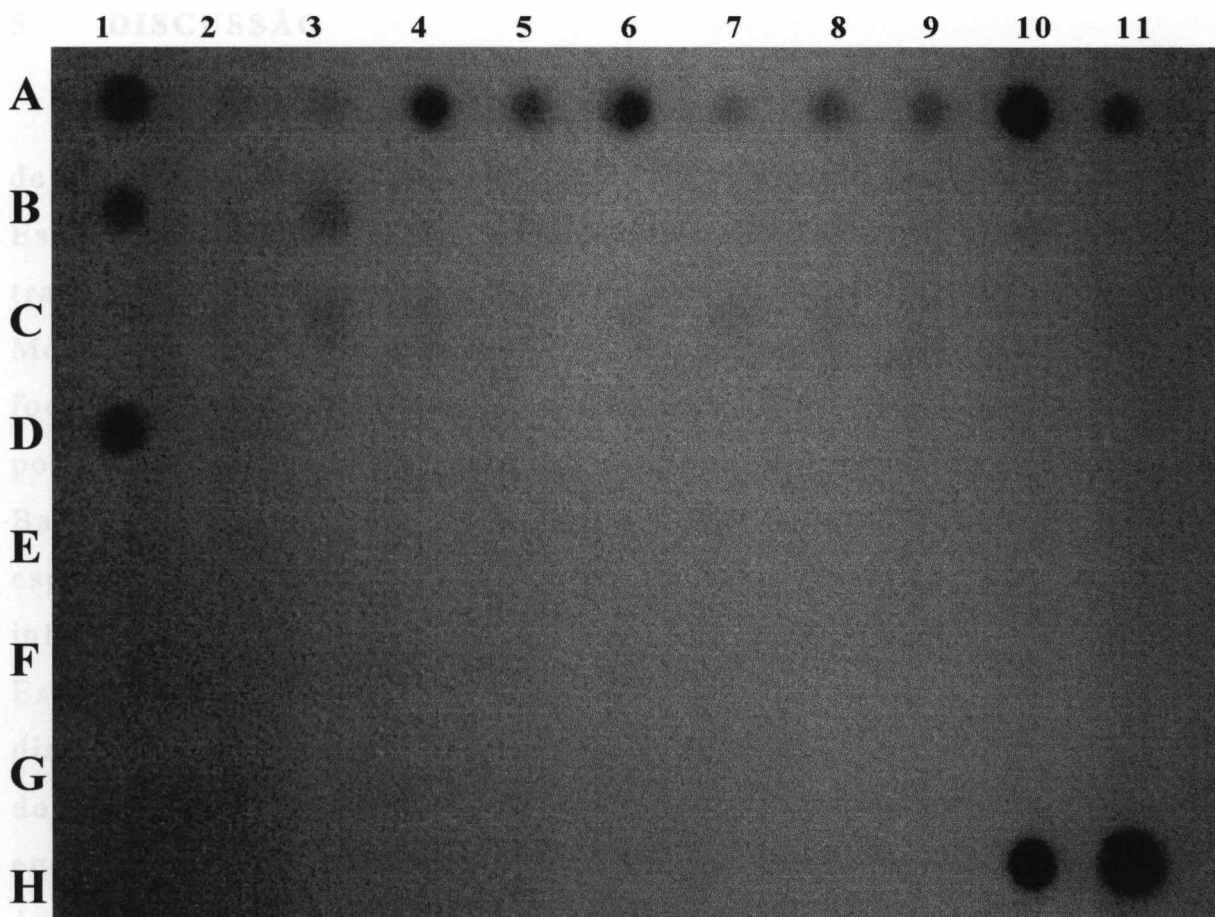


Figura 10 – Dot-blot dos produtos de PCR das amostras utilizando sondas de *Leishmania (Viannia) sp.*

A1 a H11, amostras positivas

B1 e B3, amostras positivas

C3 a C8 e C11, amostras positivas

D1, amostra positiva

B2 e B4 a B11, amostras negativas

C1, C2, C4 a C8 e C10, amostras negativas

D2 a D11, amostras negativas

E1 a H8, amostras negativas

H9 - controle negativo - flebótomos não infectados

H10 - controle positivo - flebótomo infectado com *Leishmania*

H11 - controle positivo - cultura de *Leishmania*

5 DISCUSSÃO

O índice de infecção natural de flebotomíneos, por promastigotas de leishmania, em focos endêmicos de LTA, é baixo, varia de 0 a 1,19%. Este baixo índice de infecção natural não justifica a alta taxa de transmissão da doença em áreas endêmicas. ANEZ et al. (1994), em Mérida-Venezuela, após examinar 4.592 fêmeas de flebotomíneos em um foco de Leishmaniose Cutânea encontrou 17 (0,4%) fêmeas infectadas por leishmania. VEXENAT et al. (1986b), na região de Três Braços-Bahia, após examinar 1.832 fêmeas de flebotomíneos de diversas espécies, pela técnica da dissecação do tubo digestivo, não encontrou infecção natural. HOCH et al.(1986), na área endêmica para LTA no Estado da Bahia (Três Braços e Corte de Pedra), realizaram a dissecação de 23.000 flebotomíneos coletados durante 3 anos no domicílio, peridomicílio, floresta e plantações de cacau e encontraram 3 (0,01%) flebotomíneos positivos, infectados por *Leishmania braziliensis braziliensis*, sendo 2 *Lutzomyia whitmani* e 1 *Lutzomyia (Barrettomyia) sp.*

Na tentativa de esclarecer o elevado índice da doença nos focos endêmicos, e o baixo índice de infecção natural de flebotomíneos nestes focos, RYAN et al. (1990), em Três Braços – Bahia, examinaram 193 fêmeas de *Lutzomyia whitmani* coletadas no peridomicílio de um paciente que havia sido diagnosticado recentemente (15 dias após o aparecimento da lesão), e encontraram 1 flebótomo positivo (0,52 %), mostrando que o direcionamento da captura para o local onde houve transmissão recente da doença, pode resultar em um aumento do índice de infecção natural de flebotomíneos.

A técnica normalmente utilizada para o diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos é a dissecação do aparelho digestivo do díptero, e exame entre lâmina e lâminula. PEREZ et al. (1994), em Chaute, Lima-Peru, uma localidade endêmica para Leishmaniose Cutânea Andina, examinaram 5.861 fêmeas de flebotomíneos pela técnica do PCR. Estes

flebotomíneos foram separados em 713 grupos e 8 estavam positivos (1,12%). Dos 8 grupos positivos, 6 eram de *Lutzomyia verrucarum* e 2 de *Lutzomyia peruensis*, sendo que foi a primeira vez que *Lutzomyia verrucarum* foi encontrada naturalmente infectada por leishmania. Considerando que em cada grupo havia apenas 1 flebótomo infectado, o índice foi de 0,14% demonstrando que a substituição da técnica de dissecação do aparelho digestivo pelo PCR, também resultou em um melhor diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos, em áreas endêmicas. Em nossos estudos realizados no foco endêmico de Corte de Pedra – Bahia, examinamos 4.027 fêmeas pela técnica de PCR. Estes flebotomíneos foram separados em 335 grupos e 30 estavam positivos (8,9%) e considerando que existia apenas 1 flebótomo positivo em cada grupo, o índice foi de 0,74%. Estes resultados também demonstraram que a técnica de PCR resultou em melhores resultados que a técnica de dissecação do aparelho digestivo.

A técnica de PCR foi inicialmente utilizada para o diagnóstico da anemia falciforme, talassemia e outros defeitos do gene de B-globina (SAIKI et al., 1986). Atualmente, é empregada para detectar a presença do agente em várias doenças infecciosas que apresentam pobreza de agentes etiológicos circulantes, nos locais das lesões ou nos líquidos corporais.

ROGERS et al. (1988) em Manaus – AM, coletaram 81 flebótomos e realizaram a hibridização do DNA do cinetoplasto para detectar *Leishmania* e diferenciar de *Endotrypanum* e detectaram 2 *Lutzomyia umbratilis* que hibridizaram com sonda de *Leishmania braziliensis*. A sensibilidade do teste PCR para leishmaniose foi demonstrado por WILLIAMS et al. (1991) quando diagnosticou o primeiro caso autóctone de cabras domésticas no Kenya, área endêmica para calazar na África. SNOUNOU et al. (1993) determinaram a sensibilidade do teste PCR para o diagnóstico de *Plasmodium malariae* aplicado no sangue humano e no mosquito vetor, em uma vila da Guiné Bissau, onde a prevalência na população humana era alta e o diagnóstico pelo exame microscópico era

subestimado. Na Venezuela, FELICIANGELI et al (1994) examinaram 4.863 flebotomíneos, em área endêmica de leishmaniose cutânea, e detectaram positividade pelo PCR em 51 (1,19%) *Lutzomyia ovallesi* e 2 (0,47%) *Lutzomyia gomezi*, sendo 49 *Lutzomyia ovallesi* e 2 *Lutzomyia gomezi* que foram hibridizados com *L. braziliensis* e foi o primeiro relato de *Lutzomyia gomezi* infectado por *L. braziliensis*.

BRENIERE et al. (1995), coletaram 345 amostras de fezes de triatomíneos vetores da doença de Chagas, na Bolívia, e realizaram o teste PCR e exame microscópico para verificar a infecção por *Tripanosoma cruzi*. Para o *Triatoma infestans*, principal vetor na Bolívia, as técnicas foram concordantes em 85% das vezes, porém, para as outras três espécies, *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e *Triatoma sordida*, todas as amostras fecais foram negativas no exame microscópico, enquanto os resultados com PCR mostraram diversos insetos infectados pelo *Tripanosoma cruzi*

Decidimos, então, realizar o direcionamento das capturas para os peridomicílios e domicílios de pacientes na fase inicial da doença, e utilizar a técnica do PCR para o diagnóstico da infecção natural dos flebotomíneos, demonstrando assim, ocorrer um índice mais elevado da infecção natural desses dípteros, por leishmania. Na área em estudo predomina a *Leishmania braziliensis*, apesar de haver casos descritos de *Leishmania amazonensis* (BARRAL et al., 1991).

Com relação ao provável vetor da *L. braziliensis* no Sul do Estado da Bahia, RANGEL et al. (1996) incriminaram *Lutzomyia whitmani* como o vetor na Bahia e Ceará. VEXENAT et al. (1986b), identificaram a fauna de Três Braços – Bahia com 99% de *Lutzomyia whitmani*, no peridomicílio. No Sudeste do Brasil, em focos de leishmaniose cutânea, GOMES et al. (1986) e RANGEL et al. (1990) incriminaram *Lutzomyia intermedia* com vetor peridoméstico de *L. braziliensis*. No Estado de São Paulo, GOMES et al. (1989) identificaram 85% da fauna como sendo

Lutzomyia intermedia e o principal vetor da leishmaniose cutânea, neste Estado.

MARZOCHI (1989) cita que em regiões onde ocorrem as espécies *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia*, esta última tem grande importância por se adaptar mais facilmente ao ambiente doméstico, garantindo a transmissão para o homem. PEREIRA e HOCH (1990), utilizando isca humana nas capturas no peridomicílio, na região de Três Braços - Bahia, verificaram que o número de *Lutzomyia intermedia* excedeu o de *Lutzomyia whitmani*, e sugerem que *Lutzomyia intermedia* pode ser um potencial vetor.

Segundo MARZOCHI (1989), na região Nordeste e Sudeste, o vetor mais freqüente é a *Lutzomyia whitmani*, mas a *Lutzomyia intermedia* é importante porque tem estreita relação com o ambiente domiciliar, com tendência a sobreviver em ambientes modificados pelo homem, garantindo a infecção humana. VEXENAT et al. (1986b), em Três Braços-BA, verificando a fauna flebotomínica, constataram 99,5% de *Lutzomyia whitmani*, contudo, *Lutzomyia intermedia* estava presente. PEREIRA & HOCH (1990), no Estado da Bahia, mostraram que a densidade de *Lutzomyia intermedia* foi superior a de *Lutzomyia whitmani* em determinadas épocas do ano, principalmente nos meses mais quentes.

Diversos autores (ARAGÃO, 1975; GOMES, 1986; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994), citam que *Lutzomyia whitmani* está relacionada a áreas rurais secas, enquanto *Lutzomyia intermedia*, a regiões litorâneas, úmidas e vales de rios, em áreas rurais e peridomiciliares.

No período em que realizamos capturas em Corte de Pedra – Bahia, foi constatado que no verão, apesar de *Lutzomyia whitmani* ser a espécie predominante, ocorre um aumento na densidade de *Lutzomyia intermedia* e em uma captura domiciliar na localidade de Várzea, município de Valença, foi capturado um único flebótomo no ambiente intra-domiciliar e o resultado foi positivo pelo PCR. Os exemplares machos desta captura

foram identificados como *Lutzomyia intermedia*, levando a suspeita de que esta espécie está envolvida na transmissão da Leishmaniose Tegumentar no domicílio, nesta região. Embora ocorra a predominância da vetora *Lutzomyia whitmani*, o aparecimento da *Lutzomyia intermedia*, principalmente no domicílio, é um aspecto importante a ser esclarecido.

Apesar da identificação taxonômica dos exemplares fêmeas não ter sido realizada, pelo motivo de que aumentaria o risco de contaminação da reação de PCR, a identificação dos exemplares machos forneceu uma visão aproximada da fauna nos locais das capturas, isto porque existe uma tendência natural dos exemplares machos acompanharem as fêmeas ou vice-versa.

Difícilmente os flebotomíneos pousam em móveis e quando eram observados nas portas e janelas de madeiras significava que estavam chegando, naquele momento, no interior do domicílio. Um fato observado, foi o de que nas poucas residências que possuíam aparelho de televisão foi constatada uma densidade mais elevada de flebotomíneos. Provavelmente, a luz emitida pelos televisores funciona como atrativo para os flebotomíneos. Porém, outros estudos deverão ser realizados para confirmar essa observação.

6 CONCLUSÕES

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi capaz de detectar no mínimo 10 promastigotas de leishmanias em grupos de 10 e 20 flebótomos.

Em 335 grupos de flebotomíneos examinados, 30 (8,9%) tiveram a reação positiva para leishmania pelo Dot-blot dos produtos de PCR. Considerando que apenas um flebótomo estava infectado em cada grupo positivo, a taxa de flebotomíneos infectados foi 0,74% nas 4027 fêmeas de flebotomíneos coletadas.

Os produtos do PCR hibridizaram somente com sondas de *Leishmania (Viannia) sp.*

Os resultados mostram que o direcionamento das capturas para o peridomicílio e domicílio de pacientes recentes de Leishmaniose Tegumentar e o uso do PCR, melhoram a detecção de flebotomíneos infectados por leishmania, em áreas endêmicas e pode ser uma ferramenta útil para avaliar padrões de infecção por leishmania.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C.M.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R.; DEANE, L.M. Study of an outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela: the role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**:181-95, 1984.
- ANEZ, N.; NIEVES, D.; CAZORLA, D.; OVIEDO, M.; YARBUH, A.L.; VALERA, M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mérida, Venezuela. III. Altitudinal distribution, age structure, natural infection and feeding behaviour of sandflies and their relation to the risk of transmission. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **88**:279-87, 1994.
- ARAGÃO, M.B. Sobre o comportamento de alguns insetos hematófagos. **Arq. Biol. Tecnol.**, **18**:3-23, 1975.
- ARAÚJO FILHO, N.A.; COURA, J.R.; REIS, V.L.L. Leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. III. Reservatórios silvestres e comensais. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **14**:153-61, 1981.
- ARIAS, J.R. & FREITAS, R.A. Sobre os vetores da leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. II. Incidência de flagelados em flebotomos silváticos. **Acta Amaz.**, **8**:387-96, 1978.
- ARIAS, J.R. & NAIFF, R.D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, **76**:279-86, 1981.
- BARATA, R.A.; MIRANDA, J.C.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; DIAS, E.S. Morfometrics studies of different populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**(Suppl):117, 1996.
- BARATA, R.A.; FORTES-DIAS, C.L.; MIRANDA, J.C.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; DIAS, E.S. Morphometric and phenetics study of different populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92** (Suppl.1):315, 1997.

- BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BONFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Linfadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Hyg.**, **53**:256-9, 1995.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; ALMEIDA, R.; JESUS, A.R.; GRIMALDI, G.J.; NETTO, E.M.; SANTOS, I.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Linfadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**:5, 587-92, 1992.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMAUDI Jr., G.; MOMEN, H.; MC MAHON-PRAT, D.; JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR., W. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**:536-46, 1991.
- BARRETTO, M.P. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1943. Tese.
- BARRETTO, A.C.; CUBA, C.C.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.; MARSDEN, P.D.; MAGALHÃES, A.V. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. II. Leishmaniose Canina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **17**:59-65, 1984.
- BARRETTO, A.C.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.; CUBA, C.C.; LAGO, E.; PETERSON, N.E. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in equines from an endemic area of the state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**:63, 1986.
- BARRETTO, A.C.; PETERSON, N.E.; LAGO, E.; ROSA, A.C.; RIBEIRO, R.S.M.; CUBA, C.A.C.; VEXENAT, L.A.; MARSDEN, P.D. *Leishmania mexicana* in *Proechimys iheringi denigratus* Moojen (Rodentia, Echimyidae) in a region endemic for american cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18** :243-6, 1985.

- BONFATE-GARRIDO, R. & BARRETO, T. Leishmaniasis tegumentaria americana en el distrito Urdaneta, Venezuela. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, **91**:30-8, 1981.
- BRANDÃO-FILHO, S. & SHAW, J. Leishmaniasis in Brazil. **Parasitol. Today**, **10**, :329-30, 1994.
- BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; CARRASCO, R.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Tripanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:179-84, 1995.
- CARVALHO, M.E.S.D.; LUSTOSA, E.S.; NAVES, H.A.M. Contribuição ao conhecimento da fauna flebotômica do Estado de Goiás e Distrito Federal. II. 1986-1987. **Rev. Patol. Trop.**, **18**:7-14, 1989.
- CENTRO DE PLANEJAMENTO DO CACAU. CEPLAC. Teolândia: dados pluviométricos de 1984-1986: Mensal/ Anual / Média Mensal. Teolândia, Bahia, jan. 1998.
- COSTA, J.M.L.; TADA, M.S.; NETTO, E.M.; VALE, K.C.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Procedência de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas de Três Braços e Corte de Pedra - Estado da Bahia - Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**:145-9, 1988.
- CUBA, C.A.; VEXENAT, J.A.; LLANOS, C.A.; MARSDEN, P.D.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C. Experimental infection of wild caught specimens of *Lutzomyia (N.) whitmani* (Diptera, Psychodidae) and their use for *Leishmania* identification. In: **REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇAS DE CHAGAS**, 9.,1982, Caxambu - Minas Gerais,1982. p.149.
- CUBA, C.A.C.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; BARRETO, A.C.; MAGALHÃES, A.V.; LAGO, E.L.; REED, S.G.; MARSDEN, P.D. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil: an Area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory Diagnosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **17**:161-7, 1984.

- DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat. Quat.**, **45** : 213, 1992.
- FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M.; SESSA, P.A. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82** :443, 1987. Research note.
- FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; BARROS, G.C.; MOMEM, H.; GRIMALDI JR., G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**:499-50, 1991.
- FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI-FILHO, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V. R.; JESUS, A.C.; ALENCAR, J.J.A. Participação do cão no ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**:155-63, 1986.
- FEIMBERG, A. P. & VOGELLSTEIN, B – A Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anl. Biochem.**,**132**:6-13, 1983.
- FELICIANGELI, M.D.; RODRIGUEZ, N.; BRAVO, A.; ARIAS, F.; GUZMAN, B. Vector of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. **Med. Vet. Entomol.**, **8**:317-24, 1994.
- FERNANDES, O.; BOZZA, M.; PASCALE, J.M.; MIRANDA, A.B.; LOPES, U.G. & DEGRAVE, M.M. – Au oligonucleotide probe derived from KDNA menirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97**: 279-84, 1996.
- FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. São Paulo: Edgard Blucher/ Universidade de São Paulo, 1973. v. 4.
- FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; SERRA, O.P.; COTRIM, M.D.; GALATI, E.A.B.; BARATA, J.M.S. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, **10**:31-43, 1976.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Relatório anual do Programa de Controle da Leishmaniose**, 1993.

GOMES, A.C. Mecanismos e significado epidemiológico da domiciliação. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, **20**:385-90, 1986.

GOMES, A.C. **Observações ecológicas sobre *Ps. intermedius* no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP 1979. Tese de Doutorado.

GOMES, A.C.; SANTOS, J.L.; GALATI, E.A.B. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. IV. Observations on the endophilic behaviour of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valey region of the S. Paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Públ.** **20**, 280-7, 1986.

GOMES, A.C.; BARATA, J.M.; ROCHA E SILVA, E.O.; GALATI, E.A. Aspectos ecológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. VI. Fauna flebotomia antropofílica das matas residuais situadas na região Centro - Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **31**:32-9, 1989.

GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; FERREIRA SANTOS, J.L.; GALATI, E.A. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. II. Ecótopo artificial como abrigo de *Ps. intermedius* e observações sobre alimentação e reprodução sob influência de fatores físicos naturais. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, **16**:149-59, 1982.

GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; SANTOS, J.L.; GALATI, E.A. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. I. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos em ecótopos artificiais com referência especial a *P. intermedius*. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, **14**:540-56, 1980.

- GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; SANTOS, J.L.; GALATI, E.A. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. III. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Ps. intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, **17**:23-30, 1983.
- GRIMALDI JR., G.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRAIRI, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**:687-725, 1989.
- HOCH, A.; RYAN, L.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.O.C.; BARRETTO, A.C. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from Phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**(Suppl.):62, 1986.
- JONES, T.C.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, A.C.; LAGO, E.; BADARÓ, R.; CERF, B.; REED, S.G.; MARTINS NETTO, E.; TADA, M.S.; FRANCA, F.; WIESE, K.; GOLIGHTLY, L.; FRIKRIG, E.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.A.C.; MARSDEN, P.D. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.**, **156**:73-83, 1987.
- LAINSON, R. The American Leishmaniasis. Some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**:569-96, 1983.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W & KILLICH, R.K. (ed.). **The Leishmaniasis in the New World: Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **Br. Med. Bull.**, **28**:44-8, 1972.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. 116p.

- LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasite of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis complexes*. **Proc. R. Soc. London B.** **199**:309-20, 1977.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; RYAN, L.; POVOA, M.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. **A leishmânia e as leishmanioses**. Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v. 1, p. 83-124.
- MARZOCHI, M.C.A. A Leishmaniose tegumentar no Brasil. In: **Grandes endemias brasileiras**. Brasília: Universidade de Brasília, 1989.
- MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging Antropozoonosis and Possibilities for their Control. **Cad. Saúde Públ.**, **10**:359-75, 1994.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Am.**:36-43, 1990.
- NEVES, D.P.; MELO, A.L.M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 524 p.
- OLIVEIRA, M.L. Relatório sobre o Programa de Controle de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Brasília: Divisão de Dermatologia Sanitária da Fundação Nacional de Saúde, 1996. (Mimeografado).
- OLIVEIRA, I. F. – **Manifestações clínico epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em Canoa - Santo Amaro - Bahia**. Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1986. Dissertação . Mestrado em Medicina Interna.
- PEREIRA, G.F.M. & FONSECA, H.H.R. Leishmaniose Tegumentar Americana: epidemiologia e controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**(supl.):45-50, 1994.

- PEREIRA, I.R. & HOCH, A. *Lutzomyia intermedia* as a suspected of *Leishmania Viannia braziliensis* in Bahia, State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **23**: 235, 1990.
- PEREZ, J.E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.; PAZ, L.; NIETO, E.; AREVALO, J.; GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia spp.* in Peru. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **88**:161-4, 1994.
- PESSOA, S.B. & COUTINHO, J.O. Infecção natural e experimental de flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. **Hospital**, **20**:25-35, 1941.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1977. 986 p.il.
- PONS, A.R & LONDRES, H. Leishmaniasis tegumentaria americana en el asentamiento campesino de Zipayare: aspectos epidemiológicos clínicos e inmunológicos: sua importância en la reforma agrária. **Kasmera**, **3**:5-60, 1968.
- RANGEL, E.F.; DE SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F. Infecção natural de *Lu. intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**:395-6, 1984.
- RANGEL, E.F.; RYAN, L., LAINSON, R.; SHAW. J.J. Observations on the sandfly (Diptera, Psychodidae) fauna Além Paraíba, State of Minas Gerais and the isolation of a parasite of the *L. braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **80**(3):373-4, 1985.
- RANGEL, E.F.; AZEVEDO, A.C.R.; ANDRADE, C.A.; SOUZA, N.A.; WERMWLINGER, E.D. Studies on sandfly fauna (Díptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **85**:39-45, 1990.

- RANGEL, E.F.; LAINSON, R.; SOUZA, A.A.; READY, P.D.; AZEVEDO, C. R. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) *sensu lato* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**:43-50, 1996.
- RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of leishmania. **Exp. Parasitol**, **71**:267-73, 1990.
- ROGERS, W.O.; BURNHEIM, P.F.. WIRTH, D. F. Detection of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hibridization . **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **39**:434-9, 1988.
- RYAN, L.; VEXENAT, A.; MARSDEN, P.D.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. [Short report]. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **84**:786, 1990.
- SABROZA, P.C.; KAWA,H.; CAMPOS, W.S.Q. Doenças transmissíveis: ainda um desafio. In: MINAYO, M.C. **Os muitos Brasis**: saúde e população na década de 80. São Paulo: Hucitec-Abrasco. 1995p. 177-244.
- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Analisis of enzymatically amplified globin and HLA-DQ DNA with allele-especific oligonucleotide probes. **Nature**, **324**:163-6, 1986.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, H.A.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed nzymatic amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-91, 1988.
- SCHOCHETMAN, G.; OU, C.Y.; JONES, W.K. Polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, **158** (6):1154-7, 1988.
- SHANNON, R.C. Methods for colleting and feeding mosquitos in jungle yelllow fever studies. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, **19**:131-48, 1939.

- SNOUNOU, G.; PINHEIRO, L.; GONÇALVES, A.; FONSECA, L.; DIAS, F.; BROWN, K.N.; ROSARIO-DO, V.E. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analyses of field samples from Guinea Bissau. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, **87**:649-53, 1993.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**:125-6, 1986a.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma Região Endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna Flebotomínica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**:293-301, 1986b.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C.; SALLES, C.C.; MAGALHÃES, A.V. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis*, Bahia, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **8**:237-8, 1986c.
- YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. 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, 1994.
- WILLIAMS, A.O.; MUTINGA, J.; RODGERS, M. Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. **Mol. Cell. Probes**, **5**:319-25, 1991.

8 APÊNDICE

**PROJETO LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
(FIOCRUZ/UFBA)
FICHA DE CAPTURA DE FLEBOTOMÍNEOS**

I - LOCALIZAÇÃO DO DOMICÍLIO:

Endereço: _____
 Município: _____
 Localidade: _____ Distância do posto médico (Km): _____
 Proprietário: _____
 Chefe da família: _____

II - CAPTURA PERIDOMICILIAR:

Data: ___/___/___ Código da captura:

Localização: _____ Distância da casa (metros): _____
 Hora do início: _____ Tempo de captura: _____
 Tipo de isca: Humana [] Luminosa [] Animal [] Especificar: _____
 Tipo de armadilha: Shannon [] CDC-luminosa [] Capturador de castro [] Falcão []
 Resultado da captura: Positiva [] Negativa [] Nº aproximado de fêmeas: _____
 Coletor: _____

III - CAPTURA DOMICILIAR:

Data: ___/___/___ Código da captura:

Localização: _____
 Hora do início: _____ Tempo de captura: _____
 Tipo de isca: Humana [] Luminosa [] Animal [] Especificar: _____
 Tipo de armadilha: CDC-luminosa [] Capturador de castro [] Falcão []
 Resultado da captura: Positiva [] Negativa [] Nº aproximado de fêmeas: _____
 Coletor: _____

IV - CARACTERÍSTICAS LOCAIS:

Característica da área: Cacaueiro [] Mata fechada [] Descampada []
 Condições meteorológicas: Chuva [] Vento forte [] Vento médio [] Vento fraco []
 Fase da lua: _____ Umidade relativa do ar: _____

Aplicação de inseticida:

Sim [] Não [] Tipo: _____ Quanto tempo: _____

Animais no peridomicílio: Galinhas [] Equinos [] Gatos []
 Cães [] Porcos [] Outros: _____

Nº de pessoas na casa: _____
 Nº de pessoas que tiveram leishmaniose: _____
 Nº de pessoas que estão com lesão: _____
 Quanto tempo iniciou: _____
 Nº pessoas que estão com íngua: _____
 Quanto tempo iniciou: _____

V - CARACTERÍSTICAS DO CASO CLÍNICO:

Paciente:		Apelido:		LTCP:
Idade:	Sexo:	Ocupação:	Tempo de moradia:	
Local provável de contágio:			Lesão []	Cicatriz [] Íngua []

