

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**INFECÇÃO DE *Lutzomyia longipalpis* POR *Leishmania*
spp. EM ÁREA URBANA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL**

Diego Pacheco dos Santos
Biólogo

ARAÇATUBA – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

INFECÇÃO DE *Lutzomyia longipalpis* POR *Leishmania*
spp. EM ÁREA URBANA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL

Diego Pacheco dos Santos
Orientadora: Profa. Adjunto Cárís Maroni Nunes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP
2013

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Santos, Diego Pacheco

S237i

Infecção de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* spp. em área urbana endêmica para leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, Brasil / Diego Pacheco dos Santos.

Araçatuba: [s.n], 2013

45f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientadora: Profa. Adj. Cárís Maroni Nunes

1. Saúde pública 2. Doenças endêmicas. 3. *Leishmania* 4. Infecção 5. Ecossistema

CDD 353.6

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

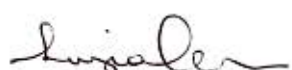
TÍTULO: Infecção de Lutzomyia longipalpis por Leishmania spp. em área urbana endêmica para leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, Brasil.

AUTOR: DIEGO PACHECO DOS SANTOS

ORIENTADORA: Dra. CÂRIS MARONI NUNES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. CLÁUDIO CASANOVA


Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ


Dra. CÂRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 14 de agosto de 2013.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. CÂRIS MARONI NUNES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIEGO PACHECO DOS SANTOS – nascido em 09 de março de 1987, na cidade de Araçatuba – SP, bacharel e licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Paulista (UNIP), campus de Araçatuba, 2008. Ingressante no programa de Pós-graduação, *Stricto Sensu*, em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – FMVA/UNESP em março de 2011. Atua como professor na rede pública de ensino fundamental e médio do Estado de São Paulo.

*“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o com todas as tuas forças,
porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra, nem projeto,
nem conhecimento, nem sabedoria alguma”.*

Eclesiastes 9:10 (Bíblia Sagrada)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, à minha esposa e filhos
(Lígia, Heitor e Felipe), familiares
e amigos, pelo amor, apoio e sustento
no desenvolvimento desta obra.
Para todo sempre, obrigado!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sua graça imensurável em dar-me vida e inúmeras oportunidades. A Ele todo louvor.

Aos meus pais e meu irmão pela base emocional e construção de quem sou. Amo vocês.

À minha esposa e filhos por tanto amor. Obrigado por dividirem seus preciosos tempos com minhas “intermináveis” tarefas. A vocês todo meu amor.

Aos meus familiares (sogros, cunhados, tios e agregados!) por todo carinho e companheirismo.

Aos amigos de fé com os quais divido parte da minha vida toda semana em nossa comunidade cristã. Obrigado por me ajudarem na caminhada com Cristo.

Aos meus colegas de trabalho, equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA), por se tornarem amigos mais chegados que irmão. Vocês são especiais e me ensinaram mais sobre relacionamentos. Muito sucesso a todos.

Em especial à Cárís Maroni Nunes que aceitou o desafio de me orientar, tornando possível esta conquista. Que tudo que faça prospere. Você é especial, obrigado pelas lições de vida.

À SUCEN, nas pessoas de Lilian Aparecida Colebrusco Rodas, Cláudio Casanova, Neusa Fernandes Chierici, e toda equipe, pela captura, cessão e análises morfo e parasitológicas das amostras.

Ao engenheiro agrônomo Carlos Alberto Conforti Lang, da Casa de Agricultura de Osvaldo Cruz, escritório municipal da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), pela disponibilização de dados climáticos para a pesquisa.

À Luís Henrique Camargo Costa, aluno de iniciação científica do LBBMA, e Dandara Camila Morais Pereira, aluna regular do programa de mestrado da unidade, por todo empenho e colaboração no cumprimento das

etapas laboratoriais: quanto trabalho! Valeu à pena. Foi uma honra trabalhar com vocês.

Aos doutores, Claudio Casanova, Luzia Helena Queiroz, Marcelo Vasconcelos Meireles e Carlos Noriyuki Kaneto, pelas sugestões e acertos no desenvolvimento do presente estudo.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba: professores, funcionários e ao programa de pós-graduação pela oportunidade e contribuição nesta conquista.

À bibliotecária Isabel Pereira de Matos pela excelente e oportuna colaboração e disponibilidade nas correções estruturais desta obra.

À Capes pela concessão de bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Páginas

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
Objetivo.....	19
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 – ABUNDÂNCIA E TAXA DE INFECÇÃO DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> EM ÁREA URBANA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	27
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
Área de estudo.....	30
Flebotomíneos.....	31
Avaliação parasitológica.....	31
Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp. por PCR convencional.....	32
Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	38
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1 – Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados com aspirador manual no município de Osvaldo Cruz, SP, Brasil, nos anos de 2011 e 2012.....34

FIGURA 2 – Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* e fatores climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) em Osvaldo Cruz, SP, Brasil.....35

FIGURA 3 – Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados e percentual de fêmeas positivas para presença de kDNA de *Leishmania* spp. em Osvaldo Cruz, SP, Brasil, nos anos de 2011 e 2012.....36

**INFECÇÃO DE *Lutzomyia longipalpis* POR *Leishmania* spp. EM ÁREA
URBANA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL**

RESUMO – As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos aos vertebrados por meio da picada de flebotomíneos. A doença consiste em um espectro de manifestações clínicas incluindo as formas tegumentar (LT) e visceral (LV), a segunda de maior importância para a saúde pública devido a sua alta taxa de letalidade. No Brasil a leishmaniose visceral ocorre em ambientes modificados pelo homem, com crescente avanço no âmbito urbano, tendo já sido relatada nas cinco regiões do país. *Lutzomyia longipalpis* é o principal veiculador da leishmaniose visceral no Novo Mundo, com grande importância no Brasil e no Estado de São Paulo, devido a sua abundância e fácil adaptação. No ciclo biológico do protozoário observa-se o desenvolvimento de formas promastigotas no vetor que se diferenciam em amastigotas no hospedeiro ao serem fagocitadas por macrófagos. Visando diminuir a crescente incidência de casos humanos e caninos, medidas preventivas e de controle voltadas ao homem, cão e vetor têm sido aplicadas no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a abundância e a taxa de infecção de *Lu. longipalpis* em área urbana endêmica para leishmaniose visceral com o intuito de contribuir com parâmetros importantes para estudos que avaliem o impacto de medidas aplicadas para o controle da LV neste novo cenário.

Palavras-Chave: doenças endêmicas, *Leishmania*, infecção, saúde pública, ecossistema

**INFECTION OF *Lutzomyia longipalpis* BY *Leishmania* spp. IN URBAN AREA
ENDEMIC FOR VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE STATE OF SÃO
PAULO, BRAZIL**

SUMMARY – Leishmaniasis are zoonotic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* transmitted to vertebrates thru the bite of sandflies. The disease consists of a spectrum of clinical manifestations including the tegumentary (TL) and the visceral leishmaniasis (VL) forms, the latter more important for public health because of its higher lethality. Visceral leishmaniasis occurs in Brazil in environments modified by man, with an increase in the urban area where it has been reported in the five regions of country. *Lutzomyia longipalpis* is the main vector for visceral leishmaniasis in the New World, with great importance in Brazil and in the state of São Paulo due to its abundance and easy adaptation. In the biological cycle of the parasite observed development of the promastigote forms in the vector and the turning for amastigote in the host when phagocytosed by macrophages. Aiming at reducing the increasing incidence of VL in human and canine preventive and control measures targeting man, dogs and the vector have been used in Brazil. The aim of this study was to evaluate the abundance and the infection rate of *Lu. Longipalpis* by *Leishmania* spp. in an urban area endemic for visceral leishmaniasis in order to contribute to studies that assess the impact of measures applied to control LV in this new scenario.

Keywords: endemic diseases, *Leishmania*, infection, public health, ecosystem

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2004), e estão distribuídas em quatro continentes sendo consideradas endêmicas em pelo menos 88 países, 72 dos quais estão em desenvolvimento. Uma taxa de 90% do total de casos da forma visceral da doença ocorre em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2013).

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças com diversas manifestações clínicas, dentre elas, a forma visceral, a de maior importância para a saúde pública devido sua letalidade (DESJEUX, 2004; WHO, 2013).

No período compreendido entre 2001 e 2010 foram registrados 33.315 casos de leishmaniose visceral (LV) no Brasil, com 2.287 óbitos. Atualmente este agravo está distribuído em diversos estados das cinco regiões do país (BRASIL, 2013). No Estado de São Paulo, desde 1999, quando ocorreu o primeiro caso de LV, até 2013, foram registrados 2.204 casos e 192 óbitos (SÃO PAULO, 2013).

Os sintomas decorrentes da infecção humana são variados sendo que na fase inicial da doença pode-se observar febre por até quatro semanas, palidez muco-cutânea e hepatoesplenomegalia. Durante a evolução clínica observa-se febre irregular, normalmente associada a emagrecimento progressivo, sendo na maioria dos casos observado um comprometimento no estado geral do indivíduo. Este período pode perdurar por mais de dois meses até que ocorra a evolução para o estágio final, no qual entre os principais sintomas há as hemorragias, icterícia e ascite. Neste período o óbito se configura por quadros de septicemia e/ou sangramentos, quando não tratada (BRASIL, 2006).

Os protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses, foram classificados de acordo com o seu comportamento no tubo digestivo do vetor, sendo divididos em dois subgêneros: *Viannia* para os parasitos que se desenvolvem na região

peripilária e *Leishmania* para os com desenvolvimento na região suprapilária (LAINSON; SHAW, 1987). Geralmente os parasitos do subgênero *Viannia* estão associados à forma tegumentar da doença entretanto, das sete espécies relatadas no Brasil como causadoras do agravo, uma delas pertence ao subgênero *Leishmania*. As principais espécies relacionadas à forma tegumentar são *L. (V.) braziliensis*, com importância no Estado de São Paulo, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007).

O subgênero *Leishmania* compreende as espécies de maior importância para a saúde pública devido à letalidade da forma visceral, sendo o complexo *L. donovani* o principal, com ocorrência das espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) infantum chagasi*, o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) nas Américas (Novo Mundo) (BRASIL, 2006; GRIMALDI et al., 1989).

Os principais vetores das leishmanioses, conhecidos como flebotomíneos, são pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (GRIMALDI et al., 1989), estando atualmente divididos em diversos gêneros. São conhecidas no mundo aproximadamente 927 espécies de flebotomíneos, 260 das quais são localizadas no Brasil, tendo sido encontradas 69 espécies no Estado de São Paulo, incluindo *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da *Leishmania infantum chagasi*, já registrado em 29 municípios do Estado (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

Os flebotomíneos apresentam pequeno porte, medindo por volta de 1 a 3 mm e abundância de pelos. Em seu ciclo de vida passam pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (alado) (KILLICK-KENDRICK, 1999). Alimentam-se de seiva vegetal, sendo as fêmeas também hematófagas, com necessidade de ao menos um repasto sanguíneo para a produção e amadurecimento dos ovos (BRASIL, 2006). Quando fazem o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos contam com a ação salivar inibitória à homeostase dos hospedeiros, induzindo a vasodilatação e inibindo a coagulação sanguínea. Geralmente este repasto ocorre após 48 horas da emergência das fêmeas, levando-se em consideração o amadurecimento das

glândulas salivares e o endurecimento das peças bucais destes insetos (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

O número de ovos por oviposição é variável, ocorrendo em ambientes com temperatura próxima a 25°C e umidade relativa do ar elevada (KILLICK-KENDRICK, 1999). A duração média para o desenvolvimento das larvas em condições favoráveis chega a duas semanas. As pupas demonstram maior resistência à variações climáticas e se desenvolvem em uma ou duas semanas, não se alimentando nem se movendo. As formas imaturas são encontradas no solo, em ambientes úmidos, onde não há incidência de luminosidade direta e com presença de matéria orgânica em decomposição. O período de desenvolvimento do ovo até o adulto geralmente varia de 30 a 40 dias, entretanto há variabilidade entre as espécies (BRASIL, 2006; RANGEL et al., 1986).

A dinâmica populacional dos vetores é diversa de uma região para outra, sendo geralmente observada abundância alta de flebotomíneos em períodos chuvosos ou logo após as chuvas (AMÓRA et al., 2010; DIAS et al., 2007; RANGEL et al., 2012). A temperatura ideal para o desenvolvimento dos flebótomos é acima de 16°C (BRANCO et al., 2013; SOARES; TURCO, 2003; TARALLO et al., 2010).

Pesquisa realizada no Estado de São Paulo, nos municípios de Espírito Santo do Pinhal e Araçatuba (região nordeste e oeste do Estado, respectivamente) revelou haver diferença na composição do feromônio sexual dos machos de *Lutzomyia longipalpis* entre as populações destas cidades (CASANOVA et al., 2006). Já em estudo realizado no município de Passira/PE, Costa et al. (2013) observaram grande capacidade de adaptação do vetor *Lu. longipalpis* a diferentes habitats e condições climáticas, sugerindo que as populações deste vetor na região nordeste do Brasil, sobrevivem e se desenvolvem com baixas quantidades de água disponível, sendo desta forma mais xerotolerantes do que as populações sulistas. Estes dados confirmam a variabilidade de uma mesma espécie possivelmente devido à adaptação a diferentes ambientes.

A avaliação da dispersão dos flebotomíneos em geral é variável (CASANOVA et al., 2005; GALATI et al., 2009; MORRINSON et al., 1993), entretanto *Lutzomyia longipalpis* em pesquisa recente de captura e recaptura, revelou que tanto os machos quanto as fêmeas foram encontrados em um raio de 200 a 700 metros do ponto inicial de captura (OLIVEIRA et al., 2013).

Lutzomyia longipalpis apresenta alto grau de adaptação a ambientes modificados antropomorficamente, sendo encontrados tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio das casas (COSTA et al., 2013; RANGEL et al., 2012). Este vetor já foi detectado em municípios de todas as regiões do Brasil, ocorrendo em áreas urbanas e/ou rurais, geralmente em associação com abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2006; MARZOCHI; MARZOCHI, 1997), com preferência alimentar variável. Camargo-Neves et al. (2007), por exemplo, avaliaram fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* capturadas no município de Araçatuba, e observaram predileção para cães, seguida de humanos e aves. Outros autores destacaram que esta variação parece estar relacionada ao caráter oportunista de *Lu. longipalpis*, estando este mais atraído pela oferta de alimento disponível no ambiente onde se adaptam (BARATA et al., 2005; MISSAWA et al., 2008).

No ciclo biológico do gênero *Leishmania*, podemos observar duas formas evolutivas: amastigotas e promastigotas. A forma amastigota, ovóide e sem flagelo, geralmente é encontrada em organismos vertebrados no sistema linfomonocitário, ficando alojada nos fagossomos dos monócitos, nos histiócitos e nos macrófagos, onde se multiplicam assexuadamente, sendo posteriormente liberadas na corrente sanguínea e linfática, iniciando assim uma reação inflamatória que exigirá a ação de mais macrófagos, ocasionando assim um ciclo vicioso (BASANO; CAMARGO, 2004; GOSSAGE et al., 2003).

Quando sugadas juntamente com o sangue pelos flebotomíneos, as amastigotas migram para o intestino médio do inseto, sendo envolvidas por uma matriz peritrófica (MP) que as protegem da ação digestiva, enquanto se diferenciam para o primeiro estágio de transformação, o de promastigota procíclica (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012), ovóide e ligeiramente móvel com um

flagelo curto (FREITAS et al., 2012). Cerca de 48 a 72 horas depois da primeira diferenciação, as formas promastigotas nectomonas (finas e alongadas) escapam pela MP, entrando em contato com o lúmen (ROGERS et al., 2002).

No próximo estágio, os parasitos recebem o nome de leptomonas e podem diferenciar-se em promastigota metacíclica ou atacarem o revestimento de quitina da válvula estomodeal como haptomonas. Sendo assim após resistirem à ação digestiva destes invertebrados, elas migram para a proboscíde que, juntamente com a destruição da válvula estomodeal, uma secreção de filamentos de proteofosfoglicanos e o bloqueio do proventrículo, facilitam um refluxo que ocasiona a inoculação passiva de parasitos em um hospedeiro num posterior repasto sanguíneo (DOSTALOVÁ; VOLF, 2012; FREITAS et al., 2012).

A identificação da infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* é usualmente realizada a partir do encontro de formas promastigotas no intestino médio, através da dissecação das fêmeas, associado optativamente ao posterior cultivo *in vitro* do protozoário. O problema mais comumente associado à identificação deste agente é a contaminação das culturas e a infecção por formas flageladas não identificáveis. Além disto, estes métodos são trabalhosos e demorados uma vez que há necessidade de dissecar muitos exemplares de insetos para confirmar a infecção (ARIAS et al., 1985).

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, em especial da reação em cadeia pela polimerase (PCR), a detecção de DNA de *Leishmania*, permitiu aumentar a sensibilidade diagnóstica em flebotomíneos. No caso das leishmânias há uma organela celular denominada cinetoplasto, composta por moléculas agrupadas de DNA, que formam maxicírculos e minicírculos, os últimos com mais de 10.000 cópias (RODGERS et al., 1990), o que favorece a detecção do protozoário mesmo quando estão presentes em pequenas quantidades.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) vem sendo relacionado como o principal reservatório da *L. (i.) chagasi*, tanto em ambientes rurais como urbanos, no Brasil e nas Américas. A elevada susceptibilidade à infecção e

parasitismo, juntamente com a proximidade ao homem, justificam a importância dos cães na manutenção da doença (FRANÇA-SILVA et al., 2003)

No Brasil as medidas de controle da LV visam a redução da morbidade e letalidade humana detectando e tratando precocemente os casos, bem como a redução da abundância do vetor, com o emprego de manejo ambiental e controle químico. A aplicação de inseticidas é usada com restrições para que não ocorra uma seleção e consequente resistência por parte dos vetores, sendo geralmente aplicados no domicílio e no entorno do caso humano. Quanto à redução da prevalência canina, a estratégia principal utilizada é a eutanásia de cães infectados, que tem se configurado como medida impopular e de difícil implementação visto seu impacto na incidência da doença ser controverso, gerando dúvidas sobre sua eficácia e utilidade (BRASIL, 2006; FRANÇA-SILVA et al. 2003; MOREIRA Jr et al. 2004).

Na tentativa de se evitar que os cães sejam infectados, algumas medidas de proteção individual têm sido propostas para uso em larga escala. Um exemplo é o uso de coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina), que resultam em efeito repelente aos flebotomíneos, diminuindo assim o número de reservatórios caninos (DAVID et al., 2001; KILLICK-KENDRICK et al., 1997; REITHINGER et al., 2004). Outra medida refere-se ao uso de vacinas. Embora a efetividade da proteção canina com as vacinas comercializadas no Brasil tenha sido avaliada revelando proteção de 43% a 95% (FERNANDES et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2005) ainda são necessários estudos que viabilizem seu uso em grande escala (BRASIL, 2006).

A abundância populacional dos vetores é um parâmetro crítico na determinação da transmissão de doenças veiculadas por vetores e a identificação das leishmânias nos flebotomíneos naturalmente infectados é essencial para avaliar a participação destes na transmissão da leishmaniose para o homem (RODRIGUEZ et al., 1999), podendo também servir como indicador da intensidade de transmissão numa determinada área. Esses parâmetros relativos ao vetor são de especial interesse em áreas com baixa

transmissão e/ou áreas onde ainda não se observam casos caninos e/ou humanos, quando ainda pode ser possível a contenção da doença.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a abundância e a taxa de infecção de *Lu. longipalpis* capturados em área urbana endêmica para leishmaniose visceral com o intuito de contribuir com estudos que avaliem o impacto de medidas aplicadas na população canina para o controle da leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição e habitats – distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R., (Org). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 207-256.

AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; DIAS, E. C.; FEIJÓ, F. M. C.; OLIVEIRA, P. G. M.; PEIXOTO, G. C. X.; ALVES, N. D.; OLIVEIRA, L. M. B.; MACEDO, I. T. F. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in na área of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n.1, p. 39-43, 2010.

ARIAS, J. R.; MILES, M. A.; NAIFF, R. D.; POVOA, M. M.; FREITAS, R. A.; BIANCARDI, C. B.; CASTELLON, E. G. Flagellate infections of brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of

Endotrypanum and *Leishmania*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 6, p. 1098-1108, 1985.

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BRANCO, S.; ALVES-PIRES, C.; MAIA C.; CORTES, S.; CRISTOVÃO, J. M. S.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L.; AFONSO, M. O. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 339-348, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: MS, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. Vigilância de A a Z. **Leishmaniose visceral**. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561>.
Acesso em: 2 fev. 2013.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotômíneos neotropicais. In: RANGEL, R. F.; LAISON, R. **Flebotômíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 257-274.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. C. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 39, p. 2-7, 2007.

CASANOVA, C.; COSTA, A. I. P.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 719-724, 2005.

CASANOVA, C.; HAMILTON, J. G. C.; TRIGO, J. R.; COSTA, A. I. P. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 113-115, 2006.

COSTA, P. L.; DANTAS-TORRES, F.; SILVA, F. J.; GUIMARÃES, V. C. F. V.; GAUDÊNCIO, K.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in na área of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**. v. 126, n. 2, p. 99-102, 2013.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1-12, 2012.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; RESENDE, D. M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C. F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K. P.; DUARTE, A. P. M.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606-612, 2012.

GALATI, E. A. B.; FONSECA, M. B.; MARASSÁ, A. M.; BUENO, E. F. M. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, in state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n. 8, p. 1148-1158, 2009.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-727, 1989.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution: In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ed). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, v. 1, p. 1-120, 1987.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 162-165, 1997.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MOREIRA Jr, E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E. G.; CARVALHO, L. P. Assessment of optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245-52, 2004.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R. B.; WILSON, M. L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 427-435, 1993.

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; PALATINIK-DE-SOUSA, C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, 2005.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; CASARIL, A. E.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 277-284, 2013.

RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986.

RANGEL, O.; SAMPAIO, S. M. P.; CIARAVOLO, R. M. C.; HOLCMAN, M. M. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 163-169, 2012.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 1, p. 47-49, 1999.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. (pt. 5), p. 495-507, 2002.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm>. Acesso em: 10 jul. 2013.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2011.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

TARALLO, V. D.; DANTAS-TORRES, F.; LIA, R. P.; OTRANTO, D. Phlebotomine sandfly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in Southern Italy. **Acta Tropica**, v. 116, n. 3, p. 227-234, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Burden of disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

CAPÍTULO 2 – ABUNDÂNCIA E TAXA DE INFECÇÃO NATURAL DE *Lutzomyia longipalpis* EM ÁREA URBANA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO – A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*, transmitido por flebotomíneos a hospedeiros mamíferos. A abundância populacional de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da *L. (i.) chagasi* no Brasil, bem como sua taxa de infecção natural, são parâmetros críticos na epidemiologia deste agravo. O objetivo deste estudo foi avaliar a abundância e a taxa de infecção de *Lu. longipalpis* em área urbana endêmica para LV, com o intuito de contribuir com parâmetros para estudos que avaliem o impacto de medidas de controle. Os flebotomíneos foram capturados com aspiradores manuais, de fevereiro de 2011 a dezembro de 2012, em oito imóveis residenciais do município de Osvaldo Cruz, SP, Brasil, selecionados pela presença do homem, cães e galinhas como fontes de alimentação para o vetor. As coletas foram realizadas quinzenalmente, por um período de três horas após o crepúsculo vespertino, no peridomicílio dos imóveis, principalmente galinheiros, abrigos dos cães, paredes externas e varanda das casas. Foram capturados 15.979 espécimes de *Lu. longipalpis* sendo 92,9% (14.843) machos e 7,1% (1.136) fêmeas, com maior abundância no mês de abril (outono). O percentual de fêmeas com presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp., ao exame parasitológico, foi de 0,18%, enquanto que a taxa mínima de positividade para a presença de kDNA de *Leishmania* spp., foi de 19,7%. A correlação positiva entre a positividade e a abundância indica que intervenções direcionadas para estes períodos devem resultar em maior controle da leishmaniose visceral.

Palavras-Chave: doenças endêmicas, *Leishmania*, infecção, saúde pública, ecossistema

**ABUNDANCE AND NATURAL INFECTION RATE OF *Lutzomyia longipalpis*
IN URBAN AREA ENDEMIC FOR VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE
STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL**

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by *Leishmania infantum chagasi*, transmitted by sandflies to mammalian hosts. The abundance of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *L. (i.) chagasi* in Brazil, as well as its rate of natural infection, are critical parameters in the epidemiology of this disease. The aim of this study was to evaluate the abundance and infection rate of *Lu. longipalpis* in an urban area endemic for VL, contributing with parameters for studies assessing the impact of control measures. Sand flies were captured with manual aspirators between February 2011 to December 2012, in eight houses in the city of Osvaldo Cruz, São Paulo, Brazil, selected by the presence of man, dogs and chickens as supply sources for the vector. Samples were collected fortnightly, for a period of three hours after twilight, outside the house, mainly in the shelters of chicken and dogs, exterior walls and balconies of houses. 15,979 specimens of *Lu. longipalpis* were captured 92.9% (14,843) of which were males and 7.1% (1,136) females, with higher abundance in April (autumn). The percentage of females with the presence of promastigotes of *Leishmania* spp., in parasitological examination, was 0.18%, while the minimum rate of positivity for the presence of kDNA of *Leishmania* spp. was 19.7%. The positive correlation between positivity and abundance indicates that targeting interventions for these periods should result in better control of visceral leishmaniasis.

Keywords: endemic diseases, *Leishmania*, infection, public health, ecosystem

Introdução

As leishmanioses são doenças zoonóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos a hospedeiros mamíferos (MURRAY et al, 2005). Esta zoonose está distribuída em pelo menos 88 países, sendo que 90% do total de casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2013). No Brasil a leishmaniose visceral (LV) já está distribuída nas cinco regiões do país (BRASIL, 2013) tendo sido registrados, no Estado de São Paulo, de 1999 (início da LV humana no Estado) até 2013, 2.204 casos com 192 óbitos (SÃO PAULO, 2013).

Os principais vetores envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanioses pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (GRIMALDI et al., 1989) e atualmente classificados em diversos gêneros no Novo Mundo (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

Lutzomyia longipalpis é considerado o principal vetor da *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, do México à Argentina (GRIMALDI et al., 1989). Este vetor já foi detectado em todas as regiões do Brasil, ocorrendo em áreas urbanas e/ou rurais, geralmente em associação a abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2006; MARZOCHI; MARZOCHI, 1997). Alimentam-se de seiva vegetal, sendo as fêmeas também hematófagas para que ocorra a produção e amadurecimento dos ovos (FORATTINI, 1973; SOARES; TURCO, 2003).

A preferência alimentar de *Lu. longipalpis* é oportunista de acordo com a disponibilidade de hospedeiros próximos ao vetor (BARATA et al., 2005; MISSAWA et al., 2008). Em estudo realizado no município de Araçatuba, SP, Brasil, a avaliação do hábito alimentar de *Lu. longipalpis* indicou preferência das fêmeas para cães, humanos e aves respectivamente (CAMARGO-NEVES et al., 2007). Além disto, têm-se observado grande adaptação de *Lu.*

longipalpis aos ambientes antropizados (COSTA et al., 2013). A dispersão destes insetos tem sido entre 200 a 700 metros (OLIVEIRA et al., 2013).

A identificação da infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* spp. é geralmente feita pela observação de formas promastigotas no intestino médio de fêmeas dissecadas, associado opcionalmente ao cultivo *in vitro* do protozoário. Entretanto, estes métodos são laboriosos devido à quantidade de espécimes necessária para confirmar a infecção, tendo sido gradativamente substituídos por métodos moleculares (MICHALSKY et al., 2002; PAIVA et al., 2006; 2007).

Devido ao amplo e contínuo avanço da doença, bem como, a grande adaptabilidade do *Lu. longipalpis* a ambientes modificados pelo homem (COSTA et al., 2013) o objetivo deste trabalho foi avaliar sua abundância e taxa de infecção por *Leishmania* spp. em área urbana endêmica para LV, com o intuito de contribuir com parâmetros necessários para estudos que avaliem o impacto de medidas de controle da leishmaniose visceral.

Material e Métodos

Área de estudo

O município de Osvaldo Cruz está localizado no extremo oeste do estado de São Paulo, Brasil (21°47'48" S; 50°52'43" O), com clima que se caracteriza como tropical chuvoso, apresentando invernos secos e verões com chuvas concentradas entre outubro e março. A média anual de pluviosidade é de 1.400mm e a temperatura de 23°C (CEPAGRI, 2013). A população estimada é de 32.229 habitantes (IBGE, 2013) com densidade demográfica de 124,47 hab/Km². A primeira detecção do vetor *Lu. longipalpis* ocorreu em 2005, com subsequente confirmação da ocorrência de casos de LV em cães e

humanos em 2007. No período de janeiro de 2007 até abril de 2013 ocorreram 40 casos de LV e cinco óbitos (SÃO PAULO, 2013). O município possui população canina estimada em 4.200 cães e a positividade canina para LV foi de 11,5% em 2011 e 6,7% em 2012 (Secretaria Municipal de Saúde, dados não publicados). A eutanásia do reservatório canino, bem como as demais medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV (BRASIL, 2006) continuaram sendo realizadas durante o período do estudo.

Flebotomíneos

Os espécimes de flebotomíneos foram capturados com aspiradores manuais (BRASIL, 2006), de fevereiro de 2011 a dezembro de 2012, em oito imóveis residenciais, com presença concomitante do homem, cão e galinha como fontes de alimentação para *Lu. longipalpis*. As coletas foram realizadas quinzenalmente, por um período de três horas, contadas a partir do crepúsculo vespertino, sendo direcionadas ao peridomicílio dos imóveis, principalmente para galinheiros, abrigos dos cães, paredes externas e varanda da casa (SÃO PAULO, 2006). As fêmeas, utilizadas para estudo da taxa de infecção, foram identificadas segundo critérios descritos por Galati (2003).

Avaliação parasitológica

As fêmeas capturadas foram eutanasiadas por baixa temperatura e imediatamente dissecadas em lâmina com a ajuda de um microscópio estereoscópico. A pesquisa de formas promastigotas no tubo digestivo foi por exame direto utilizando-se microscópio óptico, sob um aumento de 400 vezes.

Foram parcialmente retirados os conteúdos gástricos das fêmeas que tinham presença de sangue. Após a dissecação, as fêmeas foram acondicionadas separadamente em micro tubos de polipropileno contendo etanol 70%, à temperatura de -20°C, até processamento.

Amplificação de DNA de *Leishmania* spp. por PCR convencional

A extração de DNA foi realizada segundo Michalsky et al. (2002) com modificações: foram agrupados até quatro (SILVA et al., 2008) fêmeas de acordo com a data e o endereço de captura; a proteinase K foi ajustada para 100µg e volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi de 100µl. Após a extração, o DNA foi ressuspenso em volume de 50µL, sua concentração foi avaliada em aparelho *NanoDrop* (Thermo Scientific®) e conservado a -20° C.

Para amplificação do DNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990), que resultam na amplificação de um fragmento de 120 pares de base do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., segundo protocolo de Quintal et al. (2010), com modificação da temperatura de anelamento para 65°C. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (BioRad®) e posteriormente visualizadas em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

Análise estatística

A taxa mínima de positividade (TM) foi calculada de acordo com fórmula descrita por Paiva et al. (2007):

$$TM = \frac{\text{nº de pools positivos}}{\text{nº total de fêmeas}} \times 100$$

Foi utilizado o teste binomial de duas proporções para avaliar a abundância mensal dos espécimes nos anos de 2011 e 2012 bem como para a proporcionalidade das amostras positivas. Para avaliar a relação entre a abundância do vetor e as variáveis climáticas (temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar) bem como a relação entre o número de espécimes capturados e o número de amostras positivas foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Os dados referentes às médias mensais de temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos em registros da equipe de coleta no momento das capturas. As médias de precipitação pluviométrica foram cedidas pela equipe da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) do município de Osvaldo Cruz (Casa da Agricultura de Osvaldo Cruz, dados não publicados). As análises estatísticas foram realizadas no programa *BioEstat* (versão 5.3; Mamirauá/ Brasil).

Resultados

Foram capturados 15.979 espécimes de *Lu. longipalpis*, sendo 92,9% (14.843) machos e 7,1% (1.136) fêmeas (Figura 1), resultando em relação macho/fêmea de 13:1. Do total de fêmeas, 34,8% (395) delas foram capturadas em 2011 e 65,2% (741) em 2012 ($p < 0,001$). Observa-se que o mês de abril, em ambos os anos, foi o de maior abundância de flebotomíneos, entretanto não diferiu de forma estatisticamente significativa. Houve diferença estatisticamente significativa entre os anos de 2011 e 2012 para a proporção de

espécimes capturados nos meses de março ($p = 0,0025$), maio, junho, julho, setembro e novembro ($p < 0,0001$).

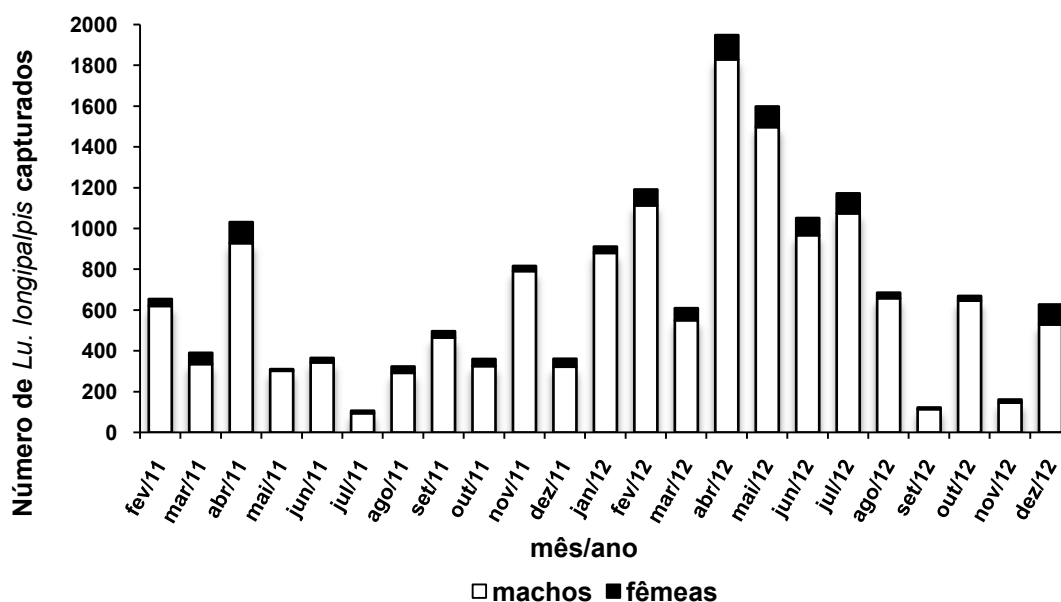


FIGURA 1 – Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados com aspirador manual no município de Osvaldo Cruz, SP, Brasil, nos anos de 2011 e 2012.

A temperatura média observada no período foi de 27,7°C (mínima de 20°C e máxima de 31°C).

Embora possamos observar que logo após períodos de alta umidade, aumentou a abundância de *Lu. longipalpis* (Figura 2), não houve correlação estatisticamente significativa entre abundância e temperatura ($r_s=0,19$; $p=0,3761$), tampouco entre abundância e umidade relativa do ar ($r_s=0,33$; $p=0,1272$) ou precipitação pluviométrica ($r_s=0,05$; $p=0,7985$).

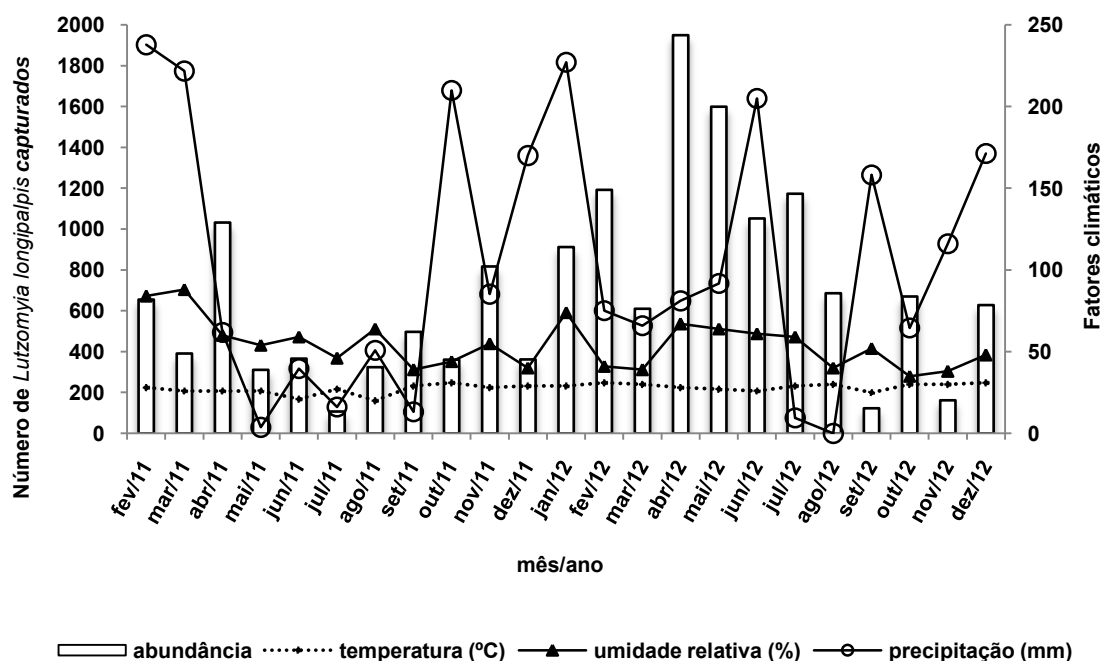


FIGURA 2 – Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* e variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação), em Osvaldo Cruz, SP, Brasil.

O percentual de fêmeas com presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. ao exame parasitológico foi de 0,18%. A taxa mínima de positividade (TM) para a presença de kDNA de *Leishmania* spp., foi de 19,7%, tendo sido de 18,7% em 2011 e 20,2% em 2012. A comparação das TMs mensais revelaram que em nove de doze meses não se observou diferença estatisticamente significativa entre os anos de 2011 e 2012. A abundância mensal de fêmeas, quando comparadas à positividade (Figura 3), resultou em correlação positiva alta ($r_s = 0,7333$; $p < 0,0001$), observando-se que à medida que aumentou a abundância, a taxa mínima de positividade aumentou.

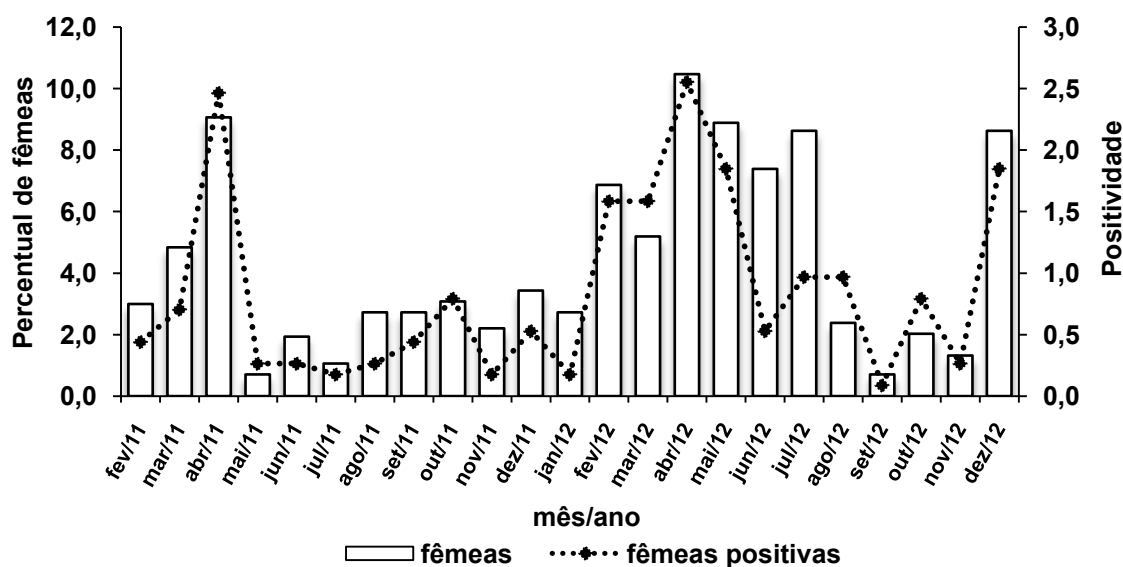


FIGURA 3 – Número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados e percentual de fêmeas positivas para presença de kDNA de *Leishmania* spp. em Osvaldo Cruz, SP, Brasil, nos anos de 2011 e 2012.

Discussão

Observou-se variação na abundância de flebotomíneos entre os anos de estudo, tendo sido maior para o ano de 2012, estando provavelmente relacionadas à maior quantidade de chuva observada naquele ano. A variação na abundância de flebotomíneos relacionada às estações seca e chuvosa, geralmente com diminuição nos meses secos e aumento durante e/ou logo após períodos chuvosos, foram relatadas em outras pesquisas no estado de São Paulo (COLLA-JACQUES et al, 2010; RANGEL et al, 2012) bem como em outras regiões brasileiras (AMÓRA et al., 2010; DIAS et al., 2007). Além da umidade, o município de Osvaldo Cruz apresentou temperatura média bem acima dos 16°C, sendo mais favorável ao desenvolvimento de flebotomíneos (SOARES; TURCO, 2003; TARALLO et al., 2010; BRANCO et al., 2013; COSTA et al., 2013). A ausência de correlação estatisticamente significativa

entre temperatura, umidade relativa do ar e abundância também foi relatada em estudo realizado por Costa et al. (2013) na região nordeste do Brasil, embora as condições climáticas sejam diferentes daquelas da região de Osvaldo Cruz, SP.

Em geral, mesmo com diferentes métodos de captura, a quantidade de machos é maior que a de fêmeas (COSTA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013), entretanto, maior relação macho/fêmea pôde ser observada no presente estudo realizado com o método de captura manual (13:1) assemelhando-se àquela observada (10:1) por Flórez et al. (2006).

A positividade de *Lu. longipalpis* observada ao exame parasitológico (0,18%) é semelhante à relatada por Nascimento et al. (2007) e Savani et al. (2009), estando provavelmente relacionada à técnica utilizada já que a observação das formas promastigotas nem sempre é possível devido à baixa sensibilidade do teste (ARIAS et al., 1985).

Nesta pesquisa a alta taxa de positividade para detecção de DNA de *Leishmania*, por PCR, pode ter sido decorrente da presença de protozoários recém ingeridos pois, embora o conteúdo gástrico das fêmeas ingurgitadas tenha sido previamente retirado para avaliação posterior do hábito alimentar, tal informação não foi devidamente registrada quando do agrupamento das fêmeas, podendo ter contribuído para este resultado.

Quanto à presença de kDNA, a positividade observada neste trabalho (19,7%) assemelha-se à relatada por Saraiva et al. (2010) (19%), em estudo realizado na cidade de Belo Horizonte - MG, embora estes autores tenham avaliado número reduzido de fêmeas de *Lu. longipalpis* (21), 4 das quais foram positivas. Por outro lado, a positividade foi bem maior que as descritas em outros estudos que também utilizaram a PCR para detecção de DNA como Flórez et al. (2006) que observaram 1,93% de positividade, Silva et al. (2008) que observaram TM de 1,9%, Savani et al. (2009) com resultado de 2,76% de positividade, bem como Michalsky et al. (2011) e Paiva et al. (2006), com 3,9% de positividade. Com exceção de Paiva et al. (2006) que utilizaram a sequência repetitiva de DNA do mini-exon como alvo para o ensaio de PCR, e Savani et

al. (2009) que utilizaram sequência de SSU rDNA, os demais autores utilizaram o kDNA com alvo para amplificação. Além da possibilidade de amplificação de DNA de leishmânias recém ingeridas pelo flebotômíneo, um viés no desenho de nosso estudo pode ter contribuído para este alto percentual de positividade visto que a captura foi direcionada a ambientes peridomiciliares com presença de pelo menos um cão, e uma galinha, o que também pode ter influenciado na alta taxa de infecção dos flebotômíneos já que pode ter ocorrido preferência dos espécimes capturados em se alimentar nos cães, conforme já observado em região endêmica para LV (CAMARGO-NEVES et al., 2007). Além disto, o método de captura também parece ter contribuído para a alta taxa de positividade uma vez que os autores já mencionados utilizaram armadilhas com isca luminosa (CDC ou Hoover Pugedo) e armadilhas Shannon em alguns deles associando a captura com aspirador manual.

Na pesquisa de Flórez et al (2006), por exemplo, a taxa de 1,93% descrita pelos autores corresponde ao total dos dois métodos de captura, entretanto, considerando-se somente os dados de capturas realizadas com aspirador manual em cães, a taxa se eleva para 5,26%.

Conclusão

O grande número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados neste estudo parece estar relacionado às condições climáticas favoráveis à sua manutenção. A alta taxa de positividade, correlacionada à abundância de *Lu. longipalpis*, indicam que as medidas de controle vetorial poderiam ser intensificadas nestes períodos, aumentando a eficácia do controle da leishmaniose visceral.

Agradecimentos

À SUCEN pela captura, identificação e análise parasitológica em lâmina dos flebotomíneos; à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado ao aluno Diego Pacheco dos Santos.

Referências

AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; DIAS, E. C.; FEIJÓ, F. M. C.; OLIVEIRA, P. G. M.; PEIXOTO, G. C. X.; ALVES, N. D.; OLIVEIRA, L. M. B.; MACEDO, I. T. F. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in the area of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n.1, p. 39-43, 2010.

ARIAS, J. R.; MILES, M. A.; NAIFF, R. D.; POVOA, M. M.; FREITAS, R. A.; BIANCARDI, C. B.; CASTELLON, E. G. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 6, p. 1098-1108, 1985.

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BRANCO, S.; ALVES-PIRES, C.; MAIA, C.; CORTES, S.; CRISTOVÃO, J. M. S.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L.; AFONSO, M. O. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 339-348, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Vigilância em Saúde, Vigilância de A a Z, **Leishmaniose visceral**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561>. Acesso em: 2 fev. 2013.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. C. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v.4, n. 39, p. 2-7, 2007.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA (CEPAGRI). Clima dos Municípios Paulistas. **Oswaldo Cruz**. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>>. Acesso em: 30 ago. 2013.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; PRADO, A. P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 208-215, 2010.

COSTA, P. L.; DANTAS-TORRES, F.; SILVA, F. J.; GUIMARÃES, V. C. F. V.; GAUDÊNCIO, K.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in na área of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**. v. 126, n. 2, p. 99-102, 2013.

DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

FLÓREZ, M.; MARTÍNEZ, J. P.; GUTIÉRREZ, R.; LUNA, K. P.; SERRANO, V. H.; FERRO, C.; ANGULO, V. M.; SANDOVAL, C. M. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em um foco suburbano de leishmaniosis visceral em El Cañón Del Chicamocha en Santander, Colombia. **Biomédica**, v. 26, n. 1, p. 109-120, 2006.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1973.

GALATI, E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, 2003 In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (org.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 53-176.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-727, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Canais. Cidades. **Oswaldo Cruz**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=353460&search=sao-paulo|osvaldo-cruz>>. Acesso em 06 set. 2013.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 162-165, 1997.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES, K. S.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Infecção natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 158-162, 2011.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NASCIMENTO, B. W. L.; SARAIVA, L.; TEIXEIRA NETO, R. G.; SERRA E MEIRA, P. C. L.; SANGUINETTE, C. C.; TONELLI, G. B.; BOTELHO, H. A.; BELO, V. S.; SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 262-268, 2013.

NASCIMENTO, J. C.; PAIVA, B. R.; MALAFRONTTE, R. S.; FERNANDES, W. D.; GALATI, E. A. B. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae)

in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 119-122, 2007.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; CASARIL, A. E.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 277-284, 2013.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 87-94, 2007.

QUINTAL, A. P. N.; RIBEIRO, E. S.; RODRIGUES, F. P.; ROCHA, F. S.; FLOETER-WINTER, L. M.; NUNES, C. M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 112-119, 2011.

RANGEL, O.; SAMPAIO, S. M. P.; CIARAVOLO, R. M. C.; HOLCMAN, M. M. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 163-169, 2012.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm>. Acesso em: 10 jul. 2013.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. São Paulo: SES, 2006.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J. D.; SILVA, S. O.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033-1039, 2010.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. In a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2011.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 343-348, 2008.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

TARALLO, V. D.; DANTAS-TORRES, F.; LIA, R. P.; OTRANTO, D. Phlebotomine sandfly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in Southern Italy. **Acta Tropica**, v. 116, n. 3, p. 227-234, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Burden of disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 2 fev. 2013.