

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no
município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.**

por

Bruno Warley Leandro Nascimento

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no
município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.**

por

Bruno Warley Leandro Nascimento

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.**

**Orientação: Dr. José Dilermando Andrade
Filho.**

**Co-orientação: Dr. Eduardo Sérgio da
Silva.**

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

N244e Nascimento, Bruno Warley Leandro.
2013

Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil / Bruno Warley Leandro Nascimento. – Belo Horizonte, 2013.

XVII, 89 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 82 - 106

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/transmissão 2. *Leishmania*/parasitologia 3. *Phlebotomus*/parasitologia III. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). IV. Silva, Eduardo Sérgio (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no
município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.**

por

Bruno Warlley Leandro Nascimento

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (Presidente)

Prof. Dra. Carina Margonari de Souza

Prof. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

Prof. Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em: 27 / 02 / 2013

"A ciência pode purificar a religião, livrando-a do erro e da superstição; a religião pode purificar a ciência, livrando-a da idolatria e dos falsos absolutos. Cada uma pode introduzir a outra num mundo mais amplo, em que ambos consigam florescer." (Santo Papa João Paulo II).

*Este trabalho é dedicado ao MEU PAI, por todos ensinamentos, amor, dedicação, paciência e presença fiel em todos os momentos de minha vida. Obrigado por todas oportunidades que o senhor me proporcionou, não teria conseguido nada sem a sua ajuda incondicional. Infelizmente nesse momento tão especial não poderei agradecê-lo pessoalmente, mas saiba que sempre lembrar-me-ei de ti e de tudo o que fizeste por mim. Sei que está feliz e orgulhoso por tudo que fez e sei também que junto de Deus sempre estará intercedendo por mim e por nossa família. Hoje estou triste por não tê-lo comigo e o meu conforto está na certeza de que um dia eu o encontrarei e assim poderei abraçar-te e dizer-lhe: **OBRIGADO MEU PAI.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e sua infinita misericórdia;

À minha Mãe, Wanda, pelo incentivo constante, amor, valores morais, por me mostrar sempre o caminho certo e por contribuir com meu desenvolvimento cultural e profissional;

Ao meu Filho, Pedro Lucas, pelo carinho e por alegrar sempre minha vida. Te amo Filho;

Aos meus irmãos, Nem, Jorge Willian e Wilkon, pelo apoio e força que sempre me deram;

À minha noiva e amor, Flaviane, que me auxiliou muito nesta etapa, com muita dedicação, paciência e compreensão. Agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida;

A todos meus familiares, que de algum modo fizeram parte dessa conquista;

Ao meu orientador, Dr. José Dilermando, agradeço pelo tempo dispendido e por tudo o que me ensinou sempre com muita ética, experiência e segurança. Foi muito bom tê-lo como orientador. Obrigado pela confiança e pela oportunidade;

Ao meu co-orientador, Dr. Eduardo Sérgio, pela amizade e pelos ensinamentos. Um exemplo de pessoa competente e profissional. Obrigado por ter confiado e acreditado em mim. Serei eternamente grato por tudo que realizou em minha vida acadêmica, pois nada teria conseguido sem o seu incentivo e apoio. Obrigado meu grande AMIGO;

À minha prestimosa colaboradora, Dra. Célia Gontijo, uma excelente pesquisadora, muito dedicada aos seus alunos. Obrigado pela paciência, imprescindível contribuição e participação para a realização desse trabalho;

À Banca de defesa da dissertação, Dra. Carina Margonari de Souza, Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati e Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro pela avaliação.

À Lara, que sempre esteve presente com sua amizade e profissionalismo. Obrigado pelos seus conselhos e preciosa ajuda;

Ao Rafael, pela enorme contribuição neste trabalho. Obrigado por ceder uma parte do seu valioso projeto a mim;

Aos meus amigos do CRNIF: Cristiani, Paula, Gustavo e Rogério pela grandiosa colaboração. À Ana Paula, Bruna, Danyele e Juliana pela convivência;

Aos amigos: Agnes, Alan, Bitu, Felipe, Gabriel, Humberto, Klauber, Renata e Vinícius pela amizade;

Aos moradores das residências pesquisadas, aqui anônimos, os meus mais sinceros agradecimentos;

À Universidade Federal de São João del Rei, campus Centro Oeste Dona Lindu;

À direção do Instituto de Pesquisas René Rachou, na pessoa da Dra. Zélia Maria Profeta da Luz;

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde;

À toda a equipe do CPqRR;

Aos órgãos de fomento, FAPEMIG, CNPq, FIOCRUZ e especialmente à CAPES, pela concessão da minha bolsa de mestrado;

Muito obrigado àqueles que direta ou indiretamente acreditaram e auxiliaram nesta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses.....	17
1.2 A Leishmaniose Tegumentar.....	17
1.3 A Leishmaniose Visceral.....	19
1.4 Agentes etiológicos da LT e LV.....	20
1.5 Hospedeiros e Reservatórios.....	24
1.6 Vetores.....	27
1.7 Estudos moleculares para detecção da infecção por <i>Leishmania</i> em flebotomíneos.....	29
1.8 Vigilância epidemiológica, prevenção e controle da LT e LV.....	30
1.9 Situação das leishmanioses no município de Divinópolis, estado de Minas Gerais.....	32
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Área de estudo.....	36
4.2 Delineamento do estudo.....	37
4.3 Métodos de coletas.....	40
4.3.1 Coletas sistematizadas.....	40
4.3.2 Coletas não sistematizadas.....	41

4.4	Preparação e montagem dos espécimes de flebotomíneos.....	41
4.5	Dissecção de fêmeas a partir de coletas não sistematizadas.....	42
4.6	Identificação das espécies.....	42
4.7	Avaliação da infecção natural utilizando abordagem molecular.....	42
4.8	Extração de DNA de <i>Leishmania</i> sp.....	43
4.9	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose 2%.....	43
4.10	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose 2%.....	44
4.11	Sequenciamento para a identificação da espécie de <i>Leishmania</i> sp., a partir da nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i>	44
4.12	Dados climáticos.....	45
4.13	Análise estatística dos dados.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Fauna flebotomínica.....	46
5.1.1	Coletas com armadilhas luminosas HP.....	46
5.1.2	Coletas com armadilhas de Shannon.....	57
5.2	Resultado da PCR – <i>ITS1</i> para espécime de <i>Lu. longipalpis</i> naturalmente infectado.....	58
5.3	Sequenciamento.....	60
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÕES.....	72
8	ANEXO.....	73
8.1	Artigo 1.....	73
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de estudo: município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.....	39
Figura 2: Exemplos de algumas residências pesquisadas no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011. (A: Bairro Jardim Alterosa, B: Bairro Oliveiras).....	39
Figura 3: Exemplos de algumas áreas de mata pesquisadas no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011. (A: Mata do Noé; B: Mata da Antena).....	39
Figura 4: Aspecto de peridomicílios onde se instalou armadilhas luminosas do tipo HP (A e B). Município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	40
Figura 5: Armadilhas luminosas do tipo HP instaladas em áreas de mata (A e B). Município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	40
Figura 6: Armadilha de Shannon instalada na Mata do Sidil. Município de Divinópolis, MG, Brasil, no mês de março de 2012.....	41
Figura 7: Número de flebotomíneos coletados por sexo no ambiente peridomiciliar, município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	48
Figura 8: Número de flebotomíneos coletados por sexo em ambiente de área verde, município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	49
Figura 9: A – Vista Geral do bairro Icaraí, município de Divinópolis, evidenciando a casa 07 (círculo); B – Aspecto do peridomicílio pertencente a casa 07 onde se instalou armadilha luminosa do tipo HP.....	52

Figura 10: Número de flebotomíneos em relação à média dos dados climáticos da semana de cada coleta. A: temperatura (°C), B: umidade relativa do ar (%) e C: precipitação (mm ³) no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	56
Figura 11: Gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos da reação de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de <i>Leishmania</i> sp. Observar amostra positiva de número 87.....	59
Figura 12: Gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos da reação de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de <i>Leishmania</i> sp.....	59
Figura 13: Alinhamento da sequência do fragmento do gene SSUrRNA de espécie de <i>Leishmania</i> , depositada no GenBank.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Casos de leishmaniose, segundo forma de manifestação clínica (tegumentar e visceral) por local de coleta de flebotomíneos.....	38
Tabela II: Número e frequência de flebotomíneos coletados, por sexo e por área, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	47
Tabela III: Porcentagem de espécies de flebotomíneos mais frequentes coletados: Peridomicílio e área verde, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro 2010 a agosto de 2011.....	48
Tabela IV: Número de flebotomíneos coletados, segundo espécie, sexo e local no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	50
Tabela V: Número de flebotomíneos coletados com armadilha luminosa tipo HP, por espécie, sexo e mês, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	53
Tabela VI: Resultado do teste de correlação entre o total de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas na semana de coleta, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.....	57
Tabela VII: Número de flebotomíneos coletados com armadilhas de Shannon, segundo mês, ano e local de coleta no município de Divinópolis.....	58
Tabela VIII: Flebotomíneos coletados com armadilha de Shannon por espécie e sexo, no município de Divinópolis, no período de dezembro de 2010 a março de 2012.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CREVISA	Centro de Referência de Vigilância em Saúde Ambiental
CRNIF	Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
d.C.	depois de Cristo
dNTP	desoxirribonucleotídeos 5´ fosfato
DMSO	Dimetilsufóxido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
kDNA	DNA do cinetoplasto
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LnPCR	Leishmania nested Polymerase chain reaction
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	miliMolar
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Base
PCR	Polymerase chain reaction - (Reação em cadeia da polimerase)
PM	Peso Molecular
Pmol	pico mols
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SINAN	Sistema Nacional de Agravos e Notificações
TBE	Tris-Borate-EDTA
U	unidades
WHO	World Health Organization
µL	microlitro
µM	micrômetro

RESUMO

A transmissão das espécies de *Leishmania* aos hospedeiros vertebrados envolve várias espécies de flebotomíneos no Brasil. Um estudo sobre a composição da fauna de flebotomíneos foi realizado no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil, área endêmica para leishmaniose tegumentar (LT), e de transmissão moderada para leishmaniose visceral (LV). Foram realizadas coletas sistematizadas mensais para captura de flebotomíneos durante um ano, de setembro de 2010 a agosto de 2011, com armadilhas luminosas HP instaladas em área urbana, em 15 peridomicílios de casas onde se registrou pelo menos um caso de LT ou LV, e em 5 fragmentos de mata. Também foram realizadas coletas não sistematizadas utilizando armadilhas de Shannon nos fragmentos de mata. A detecção de DNA de *Leishmania* sp. nos espécimes de flebotomíneos foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e para a identificação da amostra positiva foi utilizada a técnica de sequenciamento genético de fragmentos de DNA. Um total de 1.088 espécimes de flebotomíneos foram coletados pertencentes ao gênero *Brumptomyia* e *Lutzomyia*, e 18 espécies. *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da *Leishmania infantum* no Brasil, foi a espécie mais freqüente, sendo encontrada em 14 das 20 localidades. As espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* foram as únicas coletadas em todos os meses de estudo. Nenhuma das espécies foi encontrada em todas as localidades de estudo. As cinco espécies mais frequentes foram: *Lu. longipalpis* (76,9%), *Lu. lenti* (8,3%), *Lu. whitmani* (5,0%), *Lu. sallesi* (2,8%) e *Lu. aragaoi* (2,2%). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre densidade total de flebotomíneos e variáveis climáticas durante o período de estudo. As análises moleculares detectaram DNA de *Leishmania infantum* em um exemplar de *Lu. longipalpis*. Os dados apontam para a necessidade de medidas de controle da população de flebotomíneos no município de Divinópolis e adoção de estratégias de vigilância entomológica.

ABSTRACT

The transmission of *Leishmania* species to vertebrate hosts involves several species of sand flies in Brazil. A study of the sand flies fauna composition was carried out in the city of Divinópolis, Minas Gerais state, Brazil, an endemic area for cutaneous leishmaniasis (CL), and of moderated transmission of visceral leishmaniasis (VL). Monthly systematic collections were made during one year, from September 2010 to August 2011. The HP light traps were installed in peridomestic of 15 houses where at least one case of CL or VL has been recorded and in five forested areas. Systematized collections were carried out using Shannon traps. The detection of DNA of *Leishmania* sp. in the sand fly specimens was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the technique for identification of positive samples genetic sequencing of DNA fragments technique. A total of 1,088 specimens of sand flies were collected, belonging to the genera *Brumptomyia* e *Lutzomyia* and 18 species. *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Brazil, was the most frequent species, being collected in 14 of the 20 locations. The species *Lu. longipalpis* and *Lu. whitmani* were the only ones collected in every month studied. None of the collected species were found in all localities sampled. The five most abundant species were: *Lu. longipalpis* (76.9%), *Lu. lenti* (8.3%), *Lu. whitmani* (5.0%), *Lu. sallesi* (2.8%) and *Lu. aragaoi* (2.2%). No significant statistical correlation between the total sand fly density and the climatic variables was found. Molecular analysis identified natural infection by *Leishmania infantum* in one specimen of *Lu. longipalpis*. The data points to for measures to control the sand fly populations and adoption of strategies for entomological surveillance in Divinópolis municipality.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Este gênero é digenético e se apresenta sob duas formas básicas: uma flagelada denominada promastigota, que é encontrada no tubo digestório do inseto vetor e em alguns meios de cultura e outra forma sem flagelo externo, denominada amastigota, que é intracelular obrigatória, encontrada nas células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados (Ward, 1985).

As leishmanioses ocorrem em 88 países de quatro continentes e são estimados 1,6 milhões de casos novos por ano (WHO, 2010). A transmissão entre os hospedeiros vertebrados é feita pela picada de pequenos insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Martins *et al.*, 1978). Segundo Young e Duncan (1994) os vetores de *Leishmania* ssp nas Américas pertencem a apenas um gênero, *Lutzomyia*, enquanto Galati (2003) os inclui em vários gêneros, com destaque para: *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Bichronomyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia* e *Trichophoromyia*.

Os parasitos do gênero *Leishmania* podem causar doenças, que se apresentam sob duas formas clínicas básicas, a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV).

1.2 A leishmaniose tegumentar

A LT é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições na literatura desde o séc. I d.C. (Lainson, 1997; Camargo & Barcinski, 2003).

Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentavam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje, conhecida como leishmaniose cutâneo-mucosa (Lainson & Shaw, 1988). Posteriormente, em estudos de paleoparasitologia, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose tegumentar. A primeira referência de LT no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado

no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru” (Camargo & Barciski, 2003).

A LT pode apresentar variados agentes etiológicos, reservatórios, vetores e padrões de transmissão. O conhecimento sobre determinados aspectos desta zoonose ainda é limitado, o que dificulta a elaboração de estratégias de controle. Esta doença é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido às suas altas taxas de incidência e morbidade (WHO, 2010).

Segundo a OMS, 350 milhões de pessoas vivem em locais de risco para a LT em todo o mundo. Apresenta ampla distribuição mundial e no Continente Americano com registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Brasil, 2007).

A LT apresenta-se em franca expansão geográfica no Brasil, e atualmente, sua ocorrência não mais se restringe às áreas onde pessoas entram em contato com matas e animais silvestres, mas ocorre também em áreas rurais, e regiões periurbanas e urbanas (Dias *et al.*, 2007).

No Brasil, a partir da década de 80, as taxas de incidência da LT apresentam tendência de crescimento, com aumento no número de casos registrados por ano. Por exemplo, no ano de 1980 foram registrados 3.000 casos e no ano de 1995, 35.748 casos. Nos últimos anos, todas as unidades federadas registraram casos autóctones da doença. De 1985 a 2005, houve uma taxa média anual de 28,568 casos autóctones registrados e uma taxa de detecção média de 18,5 casos a cada 100.000 habitantes (Brasil, 2007).

Os primeiros casos registrados de LT no Estado de Minas Gerais foram associados ao desmatamento para a construção de rodovias e atividades agrícolas (Orsini, 1940; Martins *et al.*, 1956; Gontijo *et al.*, 2002). No entanto, a partir da última década, a epidemiologia da doença sofreu alterações, sendo descritos casos em assentamentos rurais, áreas peri-urbanas e áreas urbanas de cidades de médio e grande porte (Lainson, 1989; Passos *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006).

1.3 A leishmaniose visceral

A LV, também conhecida como calazar, possui um amplo espectro epidemiológico podendo ocorrer em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Deane & Deane, 1962; Alvar *et al.*, 2004). Clinicamente a doença é caracterizada por acessos de febre irregular, perda substancial de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e pancitopenia. Quando não tratada, geralmente é fatal no período de dois anos. A doença apresenta elevadas taxas de letalidade, cerca de 50.000 pessoas morrem com LV, anualmente (WHO, 2010).

Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos ocorridos no continente (Monteiro *et al.*, 1994; Soares & Turco, 2003). Alves & Bevilacqua (2004), entretanto, apontam que os dados relativos a morbidade da LV no Brasil não são precisos, uma vez que o progresso e aperfeiçoamento das técnicas para o diagnóstico da LV humana ocorreu recentemente. Além disso, há o problema da subnotificação, que ocorre tanto por dificuldade ou ausência de diagnóstico, ou pela não realização do procedimento de envio de dados ao Ministério da Saúde. Assim, o número de pessoas expostas à infecção ou infectadas é em algumas áreas muito maior do que o número de casos detectados (Moreno *et al.*, 2002).

O registro do primeiro caso da LV no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso do Sul (Alencar & Dietze, 1991). Em anos posteriores, a partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania* sp., sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (Penna, 1934).

No Brasil, ocorre um importante aumento no número de casos de LV, desde 1999. A migração de pessoas das áreas rurais para os subúrbios das grandes cidades resultou em assentamentos de povoados onde o parasito pode encontrar um grande número de hospedeiros não-imunes (WHO, 2010). Estas migrações criaram condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças, como a LV. Fatores como mudanças ambientais e climáticas, redução de investimentos em saúde e educação, adaptação do vetor aos ambientes modificados, dificuldades

de controle da doença em grandes centros e problemas com saneamento básico colaboram para o aparecimento de doenças (Gontijo & Melo, 2004).

A LV atualmente é considerada urbanizada, como observado em vários municípios do país (Romero & Boelaert, 2010). O município de Belo Horizonte e sua região metropolitana apresentam casos humanos de LV há mais de dez anos (Silva *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006; PBH, 2012). A doença também vem ocorrendo em outros grandes centros como no Rio de Janeiro-RJ, Araçatuba-SP, Santarém-PA, Corumbá-MS, Teresina-PI, Natal-RN, São Luís-MA, Fortaleza-CE, Camaçari-BA nos últimos dez anos (Brasil, 2006).

A LV atinge as cinco regiões brasileiras e sua maior incidência encontra-se no Nordeste. Nos últimos dez anos, o número de casos notificados na região Nordeste foi menor em comparação com a década de 90, entretanto cerca de 70% dos casos de LV no Brasil ainda são registrados nessa região (Ximenes *et al.*, 2007). Em estudo sobre a estimativa e incidência das leishmanioses no mundo, Alvar *et al.* (2012) apontam dados relevantes a respeito do Brasil, destacando que no período de 2003 a 2007 o país apresentou uma estimativa da incidência de LV variando entre 4.200 e 6.300 casos a cada 100.000 habitantes.

1.4 Agentes etiológicos da LT e LV

Os agentes etiológicos da LT e LV são protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* Ross, 1903. É um grupo complexo de organismos, com características genéticas, bioquímicas e imunológicas diferenciadas. A estrutura do DNA extranuclear do cinetoplasto (kDNA), presente nestes organismos, constitui uma característica marcante da ordem Kinetoplastida. Esta organela apresenta peculiaridades únicas e um mecanismo ímpar de replicação (Shlomai, 1994). O DNA do cinetoplasto é constituído por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos, estes últimos se repetem de cinco a dez mil vezes por célula. Nas moléculas de minicírculos são encontradas regiões conservadas, que são constantes entre as espécies, e regiões variáveis. A região conservada está relacionada à replicação dos minicírculos e possui de 120 a 200 pares de bases no gênero *Leishmania* (Rodgers *et al.*, 1990; De Bruijn & Barker, 1992).

O gênero *Leishmania* possui três subgêneros: *Leishmania sensu stricto*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* incluem cerca de 20 espécies que diferem em sua distribuição geográfica. Na Ásia, África e Europa, a LT é causada pela *Le. (Le.) major*, *Le. (Le.) tropica* Wright, 1903, *Le. (Le.) aethiopica* Manson-Bahr & Cox, 1996 e alguns zimodemos de *Le. infantum* Nicolle, 1908. Nas Américas, as espécies mais relacionadas à LT são: *Le. (Vi.) braziliensis*, espécie mais prevalente, seguida por *Le. (Le.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 e *Le. (Vi.) guyanensis* Floch, 1954, (Ashford & Bettini, 1987; Goto & Lindoso, 2010).

No Brasil, pelo menos sete espécies de *Leishmania* de ambos os subgêneros são agentes etiológicos de formas tegumentares (Lainson & Shaw, 2005). Destas, cinco pertencentes ao subgênero *Viannia*, são encontradas principalmente na região amazônica: *Le. (Vi.) guyanensis* que causa predominantemente lesão cutânea, em geral mais de uma e de pouca gravidade e *Le. (Vi.) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987, *Le. (Vi.) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Le. (Vi.) shawi* Silveira, Lainson, Braga & Ishikawa, 1989 e *Le. (Vi.) lindenberg* que raramente causam doença humana (Passos *et al.*, 1999; Gramiccia & Gradoni, 2005). *Leishmania (Vi.) braziliensis*, apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, e em outros países da América Latina. Esta espécie causa úlceras cutâneas e mucosas, e é a espécie mais frequentemente encontrada parasitando o homem (Lainson & Shaw, 2005).

Somente uma espécie do subgênero *Leishmania sensu stricto* é considerada agente etiológico de LT no Brasil, *Le. (Le.) amazonensis*. Esta espécie já foi relatada no Nordeste, Sudeste e Centro Oeste do Brasil e em geral causa leishmaniose cutânea sem envolvimento mucoso, com lesões únicas. Em alguns casos, o parasito pode disseminar-se, metastaticamente, a partir da lesão inicial no local da picada, para outros locais na pele. Este processo ocasiona lesões múltiplas, não ulceradas caracterizando a forma difusa da doença, que é de difícil tratamento (Passos *et al.*, 1999).

A LV é causada por espécies do gênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *Le. (Le.) donovani* (Lainson & Shaw, 1987). A *Le. (Le.) donovani*, é encontrada na Ásia e África e a *Le. (Le.) infantum* na Ásia, Europa, África e nas Américas (Lainson & Rangel, 2003; Shaw, 2006).

Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo, se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela

espécie *Le. infantum*, ou se a espécie já ocorre nas Américas há vários milhões de anos, desde a introdução dos canídeos e causada pela *Le. chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson & Shaw, 1987). A partir de estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares, autores consideram a *Le. chagasi* e a *Le. infantum* uma única espécie (Rioux *et al.*, 1990; Cupolillo *et al.*, 1994; Momen *et al.*, 1987; Grimaldi & Tesh, 1993) e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (Maurício *et al.*, 2000). Enquanto o impasse não se conclui definitivamente, consideraremos *Le. infantum*, o agente etiológico da LV no Brasil.

Os parasitos do gênero *Leishmania* passam por grandes mudanças morfológicas em seu ciclo de vida e diferentes estágios em regiões distintas dentro de seus hospedeiros e vetores. Estes apresentam duas morfologias principais no seu ciclo de vida: amastigota intracelular, encontrada em hospedeiro mamífero e promastigota encontrada em flebotomíneos (Hommel, 1978; Walters, 1993; Bates & Rogers, 2004; Wheeler *et al.*, 2011).

Gossage *et al* (2003) considera a biologia do parasito no hospedeiro vertebrado relativamente simples: promastigotas metacíclicos (formas infectantes) são introduzidos na pele durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotomíneos (Killick-Kendrick, 1990) e invadem os macrófagos transformando-se em amastigotas intracelulares (Handman & Bullen, 2002).

Porém, estudos indicam que após a inoculação na pele do hospedeiro formas promastigotas metacíclicas são primeiramente fagocitadas por neutrófilos. Os neutrófilos são rapidamente atraídos para o sítio da picada e são abrigos temporários para proteger a *Leishmania* sp. de um meio extracelular hostil antes de serem fagocitados pelas células hospedeiras finais, os macrófagos (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Peters *et al* (2008) mencionam ainda que os neutrófilos infectados liberam parasitos em estágios de transição que estão mais aptos a serem fagocitados pelos macrófagos e sobreviverem.

As formas amastigotas são arredondadas, sem flagelos exteriorizados e são encontradas no sistema linfomonocitário, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada, até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática (Lainson & Shaw, 1972).

A infecção do vetor, por sua vez, ocorre pela ingestão de formas amastigotas do parasito, durante o repasto sanguíneo. Neste comportamento os flebotomíneos realizam a telmofagia, durante o processo eles dilaceram os pequenos vasos presentes na derme do hospedeiro produzindo micro hemorragias (Gordon & Crewe, 1952).

Após a ingestão pelo flebotomíneo, o parasito na forma amastigota é direcionado ao intestino médio do inseto juntamente com o conteúdo alimentar. Este é envolto pela matriz peritrófica, estrutura quitinosa que envolve o sangue ingerido, separando-o do epitélio intestinal (Walters *et al.*, 1993; 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Após um período de doze a vinte horas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas (Sacks & Perkins, 1984; Descoteaux & Turco, 1999).

Estas formas se dividem por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas. O primeiro estágio no vetor é chamado promastigota procíclica, que possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica. Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas e com alta motilidade, chamadas nectomonas. Estas se dirigem para o exterior da matriz peritrófica e se aderem ao epitélio intestinal. As nectomonas se diferenciam em leptomonas, formas curtas que continuam a se replicar.

Posteriormente, alguns parasitos se diferenciam em formas haptomonas e outros em promastigotas metacíclicas, que são formas longas, apresentam um longo flagelo, alta motilidade e não mais se dividem, sendo estas as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado no momento do próximo repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo (Ashford, 2000; Choi & Lerner, 2001; Bates, 2007).

Nos flebotomíneos um padrão diferente de desenvolvimento é observado nos dois subgêneros, *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*. Os membros do subgênero *Leishmania* se desenvolvem exclusivamente no intestino médio e intestino anterior de seus vetores (desenvolvimento suprapilário), enquanto os membros do subgênero *Viannia*, incluem também uma fase de desenvolvimento no intestino posterior (desenvolvimento peripilário) (Lainson & Shaw, 1987). Ainda há o desenvolvimento hipopilário em que os parasitos se desenvolvem na porção posterior do intestino do inseto, representado pelo subgênero *Sauroleishmania*. As espécies deste gênero apresentam répteis como hospedeiros vertebrados (Momen & Cupolillo, 2000; Monteiro, 2012).

1.5 Hospedeiros e Reservatórios

Segundo a OMS, para ser incriminada como hospedeiro reservatório, a população de animais deve ser numerosa, possuir hábitos gregários freqüentes, vida longa, intenso contato com o inseto vetor, infecção leve de curso longo e o parasito infectante deve ser indistinguível do parasito encontrado no homem (Ashford, 1996). Considera-se “Reservatório”, a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorde de tempo e espaço (Brasil, 2007).

Torna-se relevante reconhecer os hospedeiros que são essenciais à manutenção do parasito (reservatórios) daqueles que são meramente incidentais (hospedeiros que se infectam, mas que apresentam baixa transmissibilidade). Entre os hospedeiros, verifica-se uma grande variedade de mamíferos (Lainson & Shaw, 1988) tais como: roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas. Alguns destes atuam como reservatórios, mantendo o ciclo nos ambientes silvestre, peri-urbano e urbano.

Espécie que ocasionam formas tegumentares da leishmaniose podem apresentar diversos reservatórios silvestres. *Leishmania (Le.) amazonensis* já foi relatada parasitando o roedor *Proechimys guyanensis* Desmarest, 1817, e com elevadas taxas de infecção 15/57 (26%) (Lainson & Shaw, 1972; Lainson *et al.*, 1981; Shaw, 1988). Outros mamíferos considerados hospedeiros de *Le. (Le.) amazonensis* são os pequenos roedores silvestres, *Oryzomys* sp. (Lainson & Shaw, 1968) e *Akodon* sp. (Telleria *et al.*, 1999) e diversas espécies de marsupiais, tais como *Metachirus* sp. e *Didelphis* sp. (Lainson & Shaw, 1998).

Os principais reservatórios de *Le. (Vi.) guyanensis* são: *Choloepus didactylus* Linnaeus, 1758 e *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Basano & Camargo, 2004). No entanto, Arias e colaboradores (1981) trabalharam em florestas nos arredores de Manaus, no Amazonas, e verificaram um alto percentual de infecção (16/36) por *Le. (Vi.) guyanensis* em *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758.

O ciclo de transmissão de *Le. (Vi.) braziliensis* é frequentemente associado a penetração humana em regiões de mata (Grimaldi & Tesh, 1993; Gramiccia & Gradoni, 2005). Em 1970, no Mato Grosso, foi detectada a primeira infecção por *Le. (Vi.) braziliensis* em roedores do gênero *Oryzomys* (Lainson & Shaw, 1970). Em Amaraji, Pernambuco, *Le. (Vi.) braziliensis* foi isolada de *Necromys lasiurus* Lund,

1841 e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 (Brandão-Filho *et al.*, 2003). Na Venezuela, este parasito também foi isolado em *Rattus rattus* e *Sigmodon hispidus* Say & Ord, 1825, o que aponta os roedores como prováveis reservatórios desta espécie (De Lima *et al.*, 2002). Marsupiais também já foram encontradas infectadas por *Le. (Vi.) braziliensis*, como espécie do gênero *Didelphis* (Silva *et al.*, 2005; Schallig *et al.*, 2007). Em um estudo realizado em Belo Horizonte, de um total de 34 marsupiais do gênero *Didelphis* capturados, Melo (2008), detectou por PCR uma taxa de infecção de 23,5%, e o agente etiológico envolvido foi caracterizado como pertencente ao complexo *Le. (Vi.) braziliensis*.

O papel do cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) como mantenedor do ciclo dos parasitos causadores da LT em focos de transmissão peridomésticos vem sendo estudado e discutido por diversos pesquisadores (Dias *et al.*, 1977; Gontijo *et al.*, 2002; Falqueto *et al.*, 2003). Apesar do encontro de animais naturalmente infectados por espécies dermatrópicas de *Leishmania* não existe um consenso quanto ao seu papel como reservatório do parasito (Falqueto *et al.*, 1991; Madeira, 2005). Em revisão de mais de 90 estudos sobre a LT em cães Reithinger & Davies (1999) concluíram que existem apenas evidências circunstanciais para suportar a hipótese de que os cães atuem como reservatórios de *Le. (Vi.) braziliensis*, sendo necessários maiores estudos.

Dantas Torres (2007) considera o cão um hospedeiro acidental deste parasito, tendo relevância nos focos de transmissão peridomiciliar e doméstica com um papel importante na epidemiologia da LT, não necessariamente atuando como reservatórios da infecção, mas atraindo vetores para habitações humanas.

Considerando a LV, os principais hospedeiros silvestres do parasito são as raposas e os marsupiais. As raposas das espécies *Lycalopex vetulus* Lund, 1842 e *Cerdocyus thous* Studer, 1905 já foram encontradas naturalmente infectadas. Sendo o primeiro relato no Ceará (Deane, 1956), mas também há relatos no Pará (Lainson *et al.*, 1990) e em Minas Gerais (Silva *et al.*, 2000).

Marsupiais do gênero *Didelphis*, já foram encontrados infectados por *Le. infantum* na Bahia (Sherlock *et al.*, 1984), no Rio de Janeiro (Cabrera *et al.*, 2003) e em Belo Horizonte (Sherlock *et al.*, 1984; Schallig *et al.*, 2007). Fato esse que comprova o possível envolvimento do grupo no ciclo de transmissão da leishmaniose nos centros urbanos. Sherlock *et al.* (1988), examinaram 84

marsupiais, *Di. albiventris* Lund, 1840, capturados em um foco de LV no estado da Bahia e isolaram *Le. infantum* de dois deles. Na Colômbia, Corredor (1989) e Travi *et al* (1994), registraram o isolamento de *Le. infantum* do gambá *Di. marsupialis* mediante o cultivo *in vitro* de baço, fígado e pele desses animais em vários meios de cultura, e da inoculação intraperitoneal em hamsters.

O isolamento de *Le. infantum* de diversas raposas da espécie *Cerdocyon thous* e de diversos gambás da espécie *Di. marsupialis*, bem como a infecção experimental em *Lu. longipalpis* alimentados nestes animais colocam essas duas espécies na categoria de reservatórios de *Le. infantum* (Travi *et al.*, 1998; Lainson & Rangel, 2005).

Resultados positivos da infecção por *Le. infantum* também já foram observados em roedores. Em São Vicente Ferrer, zona da Mata de Pernambuco, foi detectado por PCR o DNA de *Le. infantum* em amostra coletada do roedor silvestre *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Carvalho, 2005). No município de Belo Horizonte, de 62 roedores capturados, quatro animais apresentaram reação positiva para *Le. infantum* (Ferreira, 2010). E em um estudo na Reserva Indígena Xakriabá, localizada no município de São João das Missões, norte de Minas Gerais, Quaresma *et al* (2011) capturaram 97 pequenos mamíferos. Destes, dezesseis eram roedores, e quatro apresentaram-se positivos para *Le. infantum*. Os roedores positivos eram pertencentes a três espécies: *Rattus rattus*, *Rhipidomys mastacalis* Lund, 1840 e *Thrichomys apereoides* Lund, 1839.

Diversos estudos correlacionam o cão ao ciclo de transmissão da LV (Deane & Deane, 1955; Bettini & Gradoni, 1986; Evans *et al.*, 1990; Dye *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994, Silva *et al.*, 2001), e este animal é considerado o principal reservatório urbano de *Le. infantum*. O cão representa um importante elo no ciclo de transmissão da LV, e alguns fatores, como a presença de intenso parasitismo cutâneo, facilitam a infecção do flebotomíneo (Deane & Deane, 1954; Molina *et al.*, 1994; Giunchetti *et al.*, 2006).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença multissistêmica com vários sinais clínicos. A maioria dos cães sintomáticos apresenta má condição corporal, atrofia muscular generalizada e linfadenomegalia. O achado histopatológico típico em seus tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa

associada à presença de formas amastigotas de *Leishmania* no interior dos macrófagos (Baneth *et al.*, 2008).

Por outro lado, cães infectados podem controlar a expansão do parasito e a infecção subclínica pode permanecer por tempo indefinido (anos ou mesmo toda a vida) durante o qual o animal não apresenta sintomas (Alvar *et al.*, 2004; Moreno & Alvar, 2002). Molina *et al* (1994) demonstraram que mesmo cães assintomáticos podem ser fontes ativas de infecção para os vetores. Este autor também menciona que a maioria dos focos de LV humana no Brasil está relacionada a áreas onde se encontram altos índices de soroprevalência canina.

Os gatos (*Felis catus* Linnaeus, 1758), tem sido estudados por alguns autores como possíveis reservatórios da LV. Silva *et al* (2008) realizaram um estudo, em que encontraram um caso autóctone de gatos domésticos infectados por *Le. infantum* no Rio de Janeiro. O animal vivia em uma área periurbana endêmica para LV.

Já Silva *et al* (2010), relataram o primeiro caso de infecção de *Lu. longipalpis* por *Le. infantum* através da técnica de xenodiagnóstico em um gato naturalmente infectado no município de Belo Horizonte. Durante o exame físico o gato ainda apresentou sinais de leishmaniose visceral felina, como dermatite furfurácea, caquexia, fadiga muscular, atrofia, anorexia, fraqueza e uma ferida perto do pavilhão auricular esquerdo. Vides *et al* (2011) ainda encontraram formas amastigotas de *Leishmania* sp. em órgãos linfóides destes animais em estudo em Araçatuba, São Paulo. Estes dados são importantes, pois podem indicar uma possível participação deste animal na circulação de *Le. infantum* em áreas urbanas.

1.6 Vetores

As leishmanioses são transmitidas através da picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. Os flebotomíneos são insetos pequenos de 2 a 4 mm de comprimento, de cor palha ou castanho claro, e conhecidos, especialmente no Brasil, por diversos nomes populares como, anjinho, cangalhinha, mosquito palha, birigui, flebóti, etc (Dias, 2011).

Nas Américas, as primeiras espécies de flebotomíneos foram descritas em 1907, e até 1940, somente 33 espécies eram conhecidas. A partir da descoberta de que algumas espécies de flebotomíneos estariam participando como vetores na transmissão de agentes patogênicos ao homem e a outros animais, os estudos

sobre esses insetos aumentaram consideravelmente. Tais estudos visam entre outras coisas conhecer o ciclo vital desses insetos e conhecer a fauna flebotomínica das regiões (Aragão, 1922; Barretto, 1943; Forattini, 1973). Atualmente, existem cerca de 900 espécies de flebotomíneos descritas. E aproximadamente 510 são encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo. Mais de 100 espécies são suspeitas de agirem como vetores de *Leishmania* sp., mas pouco menos de 50 são realmente vetores comprovados (Lainson & Rangel, 2005).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, o ciclo vital destes insetos compreende as fases de ovo, larva, que apresentam quatro estádios, pupa e adulto. Na maioria das espécies, na larva de primeiro instar observa-se um único par de cerdas caudais, diferentemente da larva de segundo a quarto instar que apresentam dois pares de cerdas caudais (Brazil & Brazil, 2003; Dias, 2011).

As larvas dos flebotomíneos são pequenas (<12mm), claras, vermiformes, com cápsula cefálica escura e esclerotizada. Após a eclosão, as larvas de primeiro estágio alimentam-se de matéria orgânica em decomposição (Young & Duncan, 1994). Estas podem ser encontradas no solo, em tocas de animais, em folhas mortas, e em outros micro habitats úmidos (Hanson, 1961).

O tempo de desenvolvimento das larvas de algumas espécies de flebotomíneos pode ser de apenas 18 dias, mas este período pode ser prolongado por meses em condições desfavoráveis, como clima frio e seco, retardando a transformação da larva em pupa (Young & Duncan, 1994).

Pouco se sabe a respeito dos criadouros dos flebotomíneos. As larvas apresentam grande mobilidade ao se deslocarem em busca de alimento, além disso uma infinidade de ecótopos pode ser utilizada como abrigo para o inseto adulto (Andrade Filho *et al.*, 1998). Estas são algumas das razões pela quais os criadouros naturais dos flebotomíneos são difíceis de serem encontrados e este fato contribui para um maior número de ações direcionadas ao inseto adulto nas estratégias de controle das leishmanioses (Sherlock, 2003; Alencar, 2007).

Antes de se transformar em pupa, a larva de 4^o instar deixa de se alimentar e procura um lugar, geralmente mais seco. A pupa permanece ligada a um substrato, como uma folha morta, pedra ou outro objeto. A fase de repouso dura de 7 a 12 dias e os machos, habitualmente, emergem antes das fêmeas (Young & Duncan, 1994).

Após a emergência, em 24 horas, a genitália externa dos machos sofre uma torção de 180° e partir desta, eles tornam-se sexualmente maduros.

Adultos de ambos os sexos precisam de carboidratos (açúcares) como fonte de energia. Os carboidratos influenciam o desenvolvimento e infectividade da *Leishmania* em flebotomíneos. As fêmeas, além dos açúcares, necessitam de sangue de vertebrados para a maturação de seus ovos. Algumas espécies se alimentam apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras precisam de vários repastos para apenas um ciclo de oviposição (Young & Duncan, 1994; Brazil & Brazil, 2003; Sherlock, 2003). Os flebotomíneos, em geral, quando adultos abrigam-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa das árvores e frestas em rochas (Alexander *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993).

As mudanças ambientais, seja por fenômeno natural ou intervenção humana, como destruição das matas nativas, alteram os habitats naturais destes insetos e modificam a situação ecológica entre vetores e parasitos (Pessoa *et al.*, 2007). Fatores como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação podem influenciar na densidade populacional de flebotomíneos. A ocupação humana desordenada e invasão em áreas florestais, permitem que os vetores se aproximem cada vez mais do peridomínio e domicílio e ciclos das leishmanioses ocorram de forma extrasilvestre (Lainson & Shaw, 1998; Elnaien *et al.*, 2003; Madeira *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2012).

1.7 Estudos moleculares para detecção da infecção por *Leishmania* em flebotomíneos

O método tradicional mais utilizado para a pesquisa de parasitos no tubo digestório do vetor e identificação da espécie de *Leishmania* é a observação microscópica, após dissecação e/ou isolamento do parasito proveniente de insetos em meio de cultura. No entanto, as fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum* que apresentam forma promastigota semelhante a da *Leishmania*, o que dificulta o diagnóstico microscópico (Paiva *et al.*, 2007). A pesquisa pelo parasito *in loco* requer prática na detecção. Além disto, a técnica de cultura *in vitro* de *Leishmania* é suscetível à contaminação por microorganismo, o que pode inviabilizar o estudo de *Leishmania* (Rodriguez *et al.*, 1994, Tesh & Modi, 1984).

Entretanto, nos últimos anos, a biologia molecular têm mudado de forma significativa as oportunidades para a realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, de diagnóstico e controle de doenças (Paiva Cavalcanti *et al.*, 2008). Métodos moleculares têm sido aplicados com sucesso nos estudos sobre a competência vetorial dos flebotomíneos (Rodriguez *et al.*, 1999; Aransay *et al.*, 2000). Estes métodos apresentam como principais vantagens as taxas elevadas de sensibilidade e especificidade, independente do número, forma e localização do parasito no intestino do inseto (Perez *et al.*, 1994). Técnicas baseadas na identificação do DNA do parasito têm sido utilizadas como ferramentas para a detecção precisa e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos (Barker, 1989; Silva & Grunewald, 1999).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da *taq* DNA polimerase. A reação baseia-se em ciclos térmicos de desnaturação da fita de DNA, seguida do anelamento e da extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação (Costa, 2002).

A amplificação de seqüências alvo, seguida de sequenciamento genético ou digestão com enzimas de restrição e o desenho de “primers” específicos de determinada espécie, possibilita a identificação de espécies de *Leishmania*, por meio da visualização dos fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (Kassiri *et al.*, 2012).

1.8 Vigilância epidemiológica, prevenção e controle da LT e LV

As abordagens relacionadas à epidemiologia, prevenção e controle das leishmanioses devem interligar aspectos como: medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas e medidas administrativas.

A vigilância epidemiológica abrange desde a detecção de casos, à sua confirmação, o registro de sua terapêutica, o registro das variáveis básicas, o fluxo de atendimento e informação. Este processo também engloba a finalização das análises de dados distribuídos em indicadores epidemiológicos e indicadores operacionais, visualizando e caracterizando a distribuição da doença e de seu perfil clínico e epidemiológico (Basano & Camargo, 2004).

Os diferentes perfis epidemiológicos com os quais a LT se apresenta sugerem medidas de controle de transmissão diferenciadas. Na forma de transmissão silvestre pura ou modificada, as ações de controle são mais difíceis ou não aplicáveis frente ao caráter zoonótico da parasitose (Basano & Camargo, 2004).

Nos focos de transmissão peridomiciliar, uma ação importante que pode ser realizada é a busca da interrupção do contato homem-vetor, através do controle químico, com pulverização de inseticidas de efeito residual, proteção pessoal através de aplicações de repelente e utilização de materiais impregnados com inseticidas (Sharma & Singh, 2008).

Apesar da abundância de estudos envolvendo vacinas, e de alguns resultados otimistas, não se espera, em curto prazo, a disponibilização deste importante instrumento. Neste caso, a oferta de um sistema de saúde eficiente no diagnóstico precoce e condução clínica dos casos, seria uma alternativa para abrandar os agravos causados pela LT (Basano & Camargo, 2004).

O Brasil apresenta expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias localidades, incluindo cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria apenas no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, ilustra claramente o processo de urbanização da LV nas cidades brasileiras. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no cenário rural (Gontijo & Melo, 2004).

Um dos fatores de risco mais importantes na aquisição da LV é a exposição ao inseto vetor (Gontijo & Melo, 2004), sendo necessário identificar os fatores que realmente influenciam no controle do *Lu. longipalpis*, dada a sua alta capacidade de recolonizar o ambiente urbano (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008).

O controle baseado no reservatório canino, também tem sido revisto. Como por exemplo os experimentos com coleiras impregnadas com deltametrina, as quais têm mostrado resultados promissores na proteção dos animais (David *et al.*, 2001). Entretanto, a eutanásia de cães infectados ainda é o método recomendado pelo Ministério da Saúde (MS). Estudos indicam que a doença em cães precede o aparecimento de casos humanos e que a probabilidade de infecção para humanos aumenta em áreas com altas taxas de prevalência de infecção canina onde o vetor

está presente. O MS recomenda a prática da eutanásia em todos os animais com sorologia e/ou exame parasitológico positivos para *Leishmania* (Brasil, 2006).

Atualmente, existem duas vacinas contra a leishmaniose visceral canina (LVC) em uso no mercado: a Leishmune®, desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) e a Leishtec®, desenvolvida por grupo da Universidade Federal de Minas Gerais (Fernandes *et al.*, 2008). Embora tenham conferido níveis de proteção promissores, estas vacinas ainda carecem de mais estudos no campo (Fase III e IV) para real determinação de sua eficácia.

É fundamental considerar a heterogeneidade na transmissão em diferentes cenários urbanos a fim de apoiar adequadamente a escolha de estratégias de intervenção. A eficácia das medidas de controle pode ser modificada por vários fatores, como o nível de transmissão, o número de indivíduos susceptíveis, o tamanho da população canina e de vetores, nível socioeconômico, peridomicílio e o espaço físico (microclima, vegetação, altitude, relevo, etc.) (Werneck, 2008).

1.9 Situação das leishmanioses no município de Divinópolis, estado de Minas Gerais

O município de Divinópolis é considerado uma região endêmica de LT. Na década de 90, 135 casos humanos de LT foram relatados. De 2000 a 2011, 52 casos foram registrados pelas autoridades de Saúde, sendo 21 casos humanos notificados entre 2007 e 2011. A maioria desses casos foi notificado nos bairros Jardim Belvedere, Esplanada, São José, Catalão, e Candelária, todos nas proximidades da Mata do Noé, onde uma grande área foi desmatada (DEDCH, 2012).

Considerando a ocorrência de LV no município, nove casos foram registrados entre os anos de 2010 e 2011. De acordo com a classificação das áreas de vigilância e controle da LV, do Ministério da Saúde do Brasil, o município é classificado como uma área de transmissão moderada, pois o número médio de casos humanos de LV esteve entre 2,4 e 4,4 casos nos últimos cinco anos. Esta classificação indica a necessidade de medidas de vigilância epidemiológica com relação a LV, uma vez que outras cidades do estado de Minas Gerais tiveram o mesmo perfil histórico e atualmente são áreas de transmissão intensa de LV, por exemplo, Belo Horizonte e o município de Santa Luzia, Minas Gerais (PBH, 2012).

Entre 2004 e 2008, 33 casos de LVC foram detectados, e este número aumentou-se para 215 em 2010 (Crevisa, 2010). Margonari *et al* (2012) mencionam que estes dados foram baseados principalmente por notificações dos profissionais de saúde e não devido a um inquérito epidemiológico e sorológico detalhado no município. Até agora, 21 espécies de flebotomíneos foram registradas no município de Divinópolis (Andrade Filho *et al.*, 2008; Margonari *et al.*, 2010). Margonari *et al* (2010), encontraram ainda uma alta taxa de flebotomíneos infectados com *Leishmania* em uma área de mata do município. Em coletas realizadas com armadilhas de Shannon, 39,6% das fêmeas coletadas estavam positivas para a infecção por *Le. infantum* e *Le. braziliensis*. As principais espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas foram: *Lu. whitmani* (18,2%) e *Lu. neivai* (13,2%).

2 JUSTIFICATIVA

Os fatores ecoepidemiológicos envolvidos na gênese das diferentes formas de leishmanioses no Novo Mundo são muito complexos (Rotureau, 2006). Várias espécies de *Leishmania* são capazes de causar doença no homem e estas, por sua vez, interagem com diversas espécies de flebotomíneos (Murray *et al.*, 2005) e mamíferos hospedeiros. O resultado destas interações é uma profusa variedade epidemiológica de difícil entendimento e controle (Ashford *et al.*, 1998; Shaw, 2007).

Um aspecto importante das leishmanioses no Brasil é a adaptação de vetores comprovados de diferentes espécies de *Leishmania* a áreas urbanas de muitos municípios. Por exemplo *Lu. longipalpis*, o principal vetor da *Le. infantum*, *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani* vetores de *Le. braziliensis* são comumente coletados em áreas urbanas (Barata *et al.*, 2005; Gontijo *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009; Saraiva *et al.*, 2011).

Neste novo contexto, estudos de transmissão em áreas endêmicas urbanizadas são necessários, pois conhecimentos ecoepidemiológicos insuficientes podem contribuir para o aumento no risco da transmissão nestas áreas.

O crescimento desordenado do município de Divinópolis pode favorecer a proximidade de áreas suburbanas e áreas de florestas residuais. Este fato pode promover a ocorrência de ciclos de transmissão de leishmanioses. Mesmo com a confirmação de casos humanos de LV e LT e a realização de um estudo isolado em uma área verde no município, ainda não há estudos conclusivos sobre a epidemiologia das leishmanioses no município. E também não há estudos relacionados à caracterização das espécies de vetores presentes na cidade de Divinópolis. Estes dados são de extrema relevância para a definição de medidas de controle adequadas. Como afirmado por Silva *et al* (2001) várias zoonoses têm assumido crescente importância para a saúde pública devido à sua urbanização. Alterações em ambientes rurais e os movimentos migratórios constantes da população para a periferia das cidades facilitam esse processo.

Os novos conhecimentos gerados do estudo proposto poderão ser aplicados na escolha das medidas de controle da transmissão das leishmanioses na área estudada e podem ser considerados como um modelo de estudo vetorial para outras áreas urbanizadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar as espécies de flebotomíneos, quanto a frequência e riqueza em peridomicílios de residências onde ocorreram casos humanos de LT ou LV, e em matas urbanas, a flutuação mensal das espécies e infecção natural por *Leishmania* spp. no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Descrever a riqueza e diversidade das espécies de flebotomíneos em peridomicílios e matas da cidade de Divinópolis;

Investigar a influência de fatores climáticos na distribuição mensal dos flebotomíneos;

Determinar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos capturadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Divinópolis está localizado na zona metalúrgica, micro-região do Vale do Itapecerica (20° 8'21'' S e 44° 53'17'' W), macro-região do Alto São Francisco. O território do município possui uma área de 716 km², equivalente a 0,12% da área do estado de Minas Gerais. A população estimada é de 213 mil habitantes (IBGE, 2011) com uma taxa de crescimento populacional da ordem de 4,2% ao ano (aproximadamente 7.300 pessoas em média dos últimos 10 anos) (Seplan / PMD).

Em extensão territorial, a área urbana possui 192 km². O Município limita-se ao norte com Nova Serrana e Perdígão; ao sul com Cláudio; a leste com São Gonçalo do Pará e Carmo do Cajuru; a oeste com São Sebastião do Oeste e Santo Antônio do Monte (Seplan / PMD).

Geomorfologicamente o município encontra-se situado na região das terras altas do Sudeste, na faixa hipsométrica entre 600 e 850 m de altitude. O relevo apresenta formações típicas de planaltos dissecados, como serras e mares de morros. Geologicamente o município é formado por rochas do Pré-Cambriano Arqueozóico com baixa intensidade de mineralização. A maior parte dos solos são formados de latossolos vermelhos e alaranjados. São solos profundos, porosos, meteorizados, pouco resistentes e de reação ácida. Caracterizam-se pela baixa fertilidade e pela seca durante o inverno (Seplan / PMD).

A vegetação predominante é o cerrado, caracterizada pela existência de um estrato arbustivo com árvores espaçadas, retorcidas, em geral dotadas de cascas grossas e suberosas e de raízes profundas, e pela existência de um estrato herbáceo-graminoso. Entretanto, o campo cerrado encontra-se, em grande parte, degradado pela atividade pastoril, que no município é praticada de forma extensiva. Outro fator de degradação da vegetação é a ocupação urbana. Observa-se ao longo de alguns córregos e em alguns trechos às margens dos rios Itapecerica e Pará formações de matas galerias (Seplan / PMD).

O clima do município é classificado como mesotérmico, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos. A temperatura média de inverno é de 16°C aproximadamente. A média do mês mais quente fica em torno dos 25°C. Os meses

de dezembro, janeiro e fevereiro são os mais chuvosos. O período mais seco do ano vai de abril a setembro. A direção predominante dos ventos é a sudeste, na maior parte do ano, e a segunda dinâmica se dá na direção nordeste, durante os meses mais quentes. A umidade relativa do ar apresenta uma média de 72%. O índice pluviométrico varia de 1.200 mm³ a 1.700 mm³ anuais. O território é banhado pelos rios Pará e Itapeçerica, ambos afluentes e tributários do Rio São Francisco (Seplan / PMD).

4.2 Delineamento do estudo

Inicialmente realizou-se coletas de flebotomíneos para estudos da fauna e identificação das espécies de *Leishmania* sp. presentes nesses insetos. As armadilhas utilizadas foram luminosas automática HP (Pugedo *et al.*, 2005) utilizada para coletas noturnas e a armadilha de Shannon (Shannon, 1939), a qual utiliza fonte luminosa e/ou isca animal, para atrair os insetos, sendo estes coletados com o capturador manual de Castro (Castro, 1937).

Os locais de coletas de flebotomíneos foram as residências onde houve caso confirmado de LV ou LT nos últimos cinco. Dentre os 15 locais estudados, 11 residências apresentaram pelo menos um morador que havia acabado de se tratar, ou ainda estava em tratamento para LT e o mesmo era observado para as residências com pessoas com LV (Tabela I).

Tabela I: Casos de leishmaniose, segundo forma de manifestação clínica (tegumentar e visceral) por local de coleta de flebotomíneos.

Local de coleta/ Bairro	Leishmaniose	
	Tegumentar	Visceral
Local 01/ Jardim Alterosa	x	
Local 02/ São José	x	
Local 03/ Ipiranga	x	
Local 04/ Serra Verde	x	
Local 05/ Serra Verde	x	
Local 06/ Oliveiras	x	
Local 07/ Icaraí	x	
Local 08/ Icaraí	x	
Local 09/ Manoel Valinhas		x
Local 10/ Manoel valinhas	x	
Local 11/ Espírito Santo	x	
Local 12/ Niteroi		x
Local 13/ Niteroi		x
Local 14/ Maria Helena		x
Local 15/ Quinta das Palmeiras	x	

Os bairros pesquisados foram: Jardim Alterosa, São José, Ipiranga, Serra Verde, Oliveiras, Icaraí, Manoel Valinhas, Espírito Santo, Niteroi, Maria Helena e Quinta das Palmeiras e nas seguintes áreas de mata: Mata da Antena, Mata do Noé, Mata do Sidil, Parque do Gafanhoto e Parque da Ilha (Figuras 1, 2 e 3).

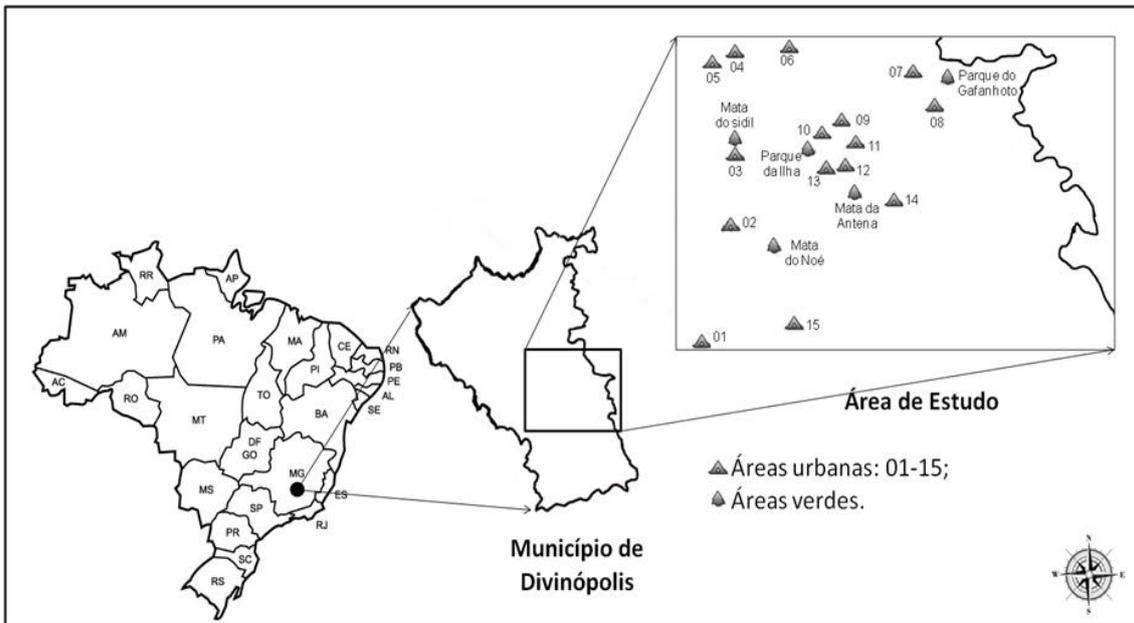


Figura 1: Área de estudo: município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.



Figura 2: Exemplos de algumas residências pesquisadas no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011. (A: Bairro Jardim Alterosa, B: Bairro Oliveiras).



Figura 3: Exemplos de algumas áreas de mata pesquisadas no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011. (A: Mata do Noé; B: Mata da Antena)

4.3 Métodos de coletas

Foram realizadas coletas sistematizadas e não sistematizadas.

4.3.1 Coletas sistematizadas

As coletas sistemáticas foram realizadas de setembro de 2010 a agosto de 2011. Vinte e cinco armadilhas luminosas foram distribuídas na área de estudo (15 no peridomicílio e 10 em áreas de mata). Nos peridomicílios foi instalada uma armadilha (quintal ou abrigos de animais) e em cada área de mata foram instaladas duas armadilhas com uma distância de aproximadamente 200 metros entre elas (Figuras 4 e 5).

Todas as armadilhas foram expostas durante três noites consecutivas sempre na primeira ou segunda semana de cada mês. O esforço amostral para esse tipo de coleta foi de 432 horas por armadilha e 10.800 horas no total.



Figura 4: Aspecto de peridomicílios onde se instalou armadilhas luminosas do tipo HP (A e B). Município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

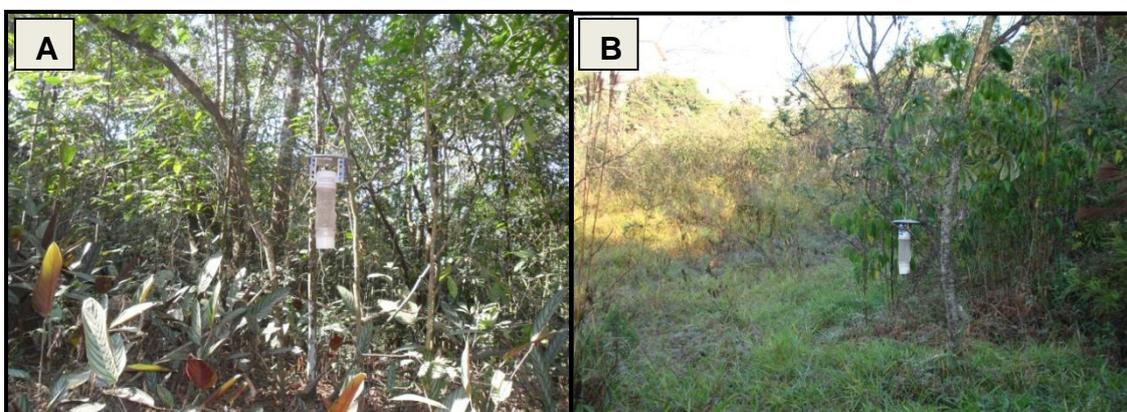


Figura 5: Armadilhas luminosas do tipo HP instaladas em áreas de mata (A e B). Município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

4.3.2 Coletas não sistematizadas

Quatro coletas não sistematizadas foram realizadas nas áreas de mata e as armadilhas foram expostas em torno das 18:00 horas e retiradas por volta da meia noite. No mês de dezembro de 2010 realizou-se uma coleta no Parque da Ilha e junho de 2011 realizou-se uma coleta no Parque do Gafanhoto

No ano de 2012, no mês de março foram feitas coletas na mata do Noé e Mata do Sidil. Objetivou-se com tais coletas capturar exemplares fêmeas, destinadas a verificação de infecção natural através da técnica de dissecação do tubo digestório. Utilizou-se armadilha de Shannon (Figura 6) e o capturador manual de Castro.



Figura 6: Armadilha de Shannon instalada na Mata do Sidil. Município de Divinópolis, MG, Brasil, no mês de Março de 2012.

4.4 Preparação e montagem dos espécimes de flebotomíneos

Os flebotomíneos antes de serem montados em lâminas foram preparados de acordo com técnicas padronizadas no Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF), para a clarificação, ou diafanização, das estruturas internas necessárias para a identificação das espécies, principalmente fêmeas. Antes do processo de clarificação, a conservação dos mesmos foi feita em álcool a 70%.

No processo de clarificação, os exemplares foram submetidos a diferentes soluções: hidróxido de potássio 10% por 3 horas; ácido acético 10% por 15 min; água tipo I (2x por 15 min.) e série crescente de alcoóis (70%, 90% e absoluto) por 15 min. cada. Em seguida os espécimes foram acondicionados em creosoto de Faia por 24 horas e posteriormente montados em bálsamo do Canadá.

4.5 Dissecção de fêmeas a partir de coletas não sistematizadas

As fêmeas capturadas nas coletas não sistematizadas foram dissecadas para a pesquisa da infecção natural por flagelados. Em uma lâmina com solução salina tamponada retirou-se o tubo digestório dos insetos com o auxílio de dois estiletos entomológicos.

Após a dissecção, o tubo digestório foi coberto por lamínula e visualizado em um microscópio óptico para possível constatação de flagelados. A cabeça e os três últimos segmentos do abdômen foram transferidos para outra lâmina e identificada a espécie.

4.6 Identificação das espécies

Os espécimes foram identificados no CRNIF/FIOCRUZ com utilização de microscópio óptico de contraste de fase NIKON eclipse E200, segundo classificação proposta por Young & Duncan (1994), Andrade Filho *et al* (2003) e Galati (2003). Alguns dos exemplares foram depositados na coleção de flebotomíneos.

4.7 Avaliação da Infecção natural utilizando abordagem molecular

As fêmeas não ingurgitadas capturadas nas coletas sistematizadas foram utilizadas para a verificação de infecção por *Leishmania* sp., feita através da PCR, após a extração do DNA genômico individual. Para a amplificação das amostras foram utilizados iniciadores que flanqueiam a região conservada do DNA ribossomal (*ITS1*) de todas as espécies de *Leishmania*.

4.8 Extração de DNA de *Leishmania* sp.

As fêmeas de flebotomíneos coletadas foram separadas e acondicionadas em álcool etílico absoluto a -20°C e submetidas à extração do DNA. Para a extração foi utilizado o kit “Gentra Puregene Core Kit A” – Marca QIAGEN. A extração baseou-se no protocolo do fabricante modificado por Quaresma *et al* (2009).

A pureza e a concentração de DNA, para todas as amostras, foram estimadas em um espectrofotômetro a 260 e 280nm. Depois, as amostras de DNA foram acondicionadas em freezer a -20°C, até o momento de uso.

4.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose 2%

Para determinar a taxa de infecção natural, as amostras de DNA extraídas de 154 fêmeas foram analisadas individualmente através da técnica PCR dirigida ao gene *ITS1* de *Leishmania*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases deste gene. Para a amplificação das amostras utilizou-se os iniciadores LITSR: 5´ CTGGATCATTTTCCGATG 3´ e L58S: 5´ TGATACCACTTATCGCACTT 3´.

A reação foi preparada para um volume final de 25µL contendo 5µL de DNA da amostra, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL do iniciador LITSR a 10µM, 1,25 µL do iniciador L58R a 10µM, 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase a 10U/ µL, 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 12,25 µL de H₂O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C por dez minutos.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 50 nanogramas de DNA extraído de cultura de *Leishmania braziliensis*, M2903 e como controle negativo utilizou-se H₂O destilada estéril no mesmo volume.

Os produtos amplificados pelas PCRs foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2,0%. O gel foi preparado com 2 g de agarose, 100 mL de TBE 1X e 10 µL de brometo de etídio. A amplificação dos produtos foi visualizada através de luz ultravioleta e os géis foram fotografados utilizando-se transluminador.

4.10 Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose 2%

A amostra positiva no PCR foi submetida à análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, através da técnica de RFLP utilizando a enzima *Hae* III. Esta endonuclease reconhece a sequência 5' GCGC 3' e catalisa a clivagem da ligação fosfodiéster nestes sítios.

O perfil de restrição foi analisado em gel de agarose 2% e comparado com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas controle de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.11 Sequenciamento para a identificação da espécie de *Leishmania* sp., a partir da nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

Foi realizado o sequenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR – SSUrRNA (aproximadamente 353 pb), para a identificação da espécie de *Leishmania* sp. A banda de 353 pb com intensidade considerável foi cortada e purificada utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µL, formada por 4 µL do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µL do iniciador na concentração de 3,2 pmol e 5 µL do produto de PCR. Este mix foi colocado em um termociclador (AB9800®) com o seguinte programa: 94°C por 3 min, seguido de 25 ciclos de: 96°C por 1 seg, 65°C por 5 seg e 60°C por 4 min. O

sequenciamento propriamente dito foi realizado no seqüenciador automatizado *ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems)*.

A análise bioinformática das seqüências obtidas foi realizada utilizando os programas *Lasergene® sequence analysis software (DNASTAR)* e o *BIOEDIT*. O alinhamento das seqüências editadas com aquelas depositadas no GenBank nos permite a identificação de três espécies de interesse na área de estudo: *Le. braziliensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum*.

4.12 Dados climáticos

Os dados climáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm³), referentes ao período de estudo foram obtidos junto à Estação Meteorológica do município. Nesta pesquisa foram utilizados os valores das médias semanais de cada variável para o estudo da sazonalidade de flebotomíneos na área pesquisada.

4.13 Análise estatística dos dados

Todas as informações coletadas foram digitadas em banco de dados, utilizando-se o programa *Epi-Info*. Foi feita dupla entrada de dados com posterior correção das divergências detectadas e verificação da consistência interna. As análises descritivas foram realizadas utilizando software *Excell (Office 2007)* e as análises estatísticas utilizando o programa *Sigma Stat*.

5 RESULTADOS

5.1 Fauna Flebotomínica

5.1.1 Coletas com armadilhas luminosas HP

Um total de 1.064 espécimes de flebotomíneos pertencentes a dois gêneros e 17 espécies foram coletados e identificados: dezesseis espécies do gênero *Lutzomyia* sendo: *Lutzomyia aragaoi* Costa Lima, 1932, *Lutzomyia bacula* Martins, Falcão & Silva, 1965, *Lutzomyia brasiliensis* Costa Lima, 1932, *Lutzomyia christenseni* Young & Duncan, 1994, *Lutzomyia cortelezzii* Brèthes, 1923, *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia lenti* Mangabeira, 1938, *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia lutziana* Costa Lima, 1932, *Lutzomyia migonei* França, 1920, *Lutzomyia monticola* Costa Lima, 1932, *Lutzomyia neivai* Pinto, 1926, *Lutzomyia pessoai* Coutinho & Barretto, 1940, *Lutzomyia sallesi* Galvão & Coutinho, 1939, *Lutzomyia sordellii* Shannon & Del Ponte, 1927 e *Lutzomyia whitmani* Antunes & Coutinho, 1939. Apenas uma espécie do gênero *Brumptomyia*: *Brumptomyia brumpti* Larrousse, 1920 foi coletada (Tabela II).

O ambiente periurbano apresentou uma riqueza de 12 espécies, enquanto no ambiente de área verde a riqueza foi de 15 espécies. *Lutzomyia cortelezzii* e *Lu. pessoai* foram coletados apenas no peridomicílio, enquanto, *Br. brumpti*, *Lu. bacula*, *Lu. christenseni*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* somente em ambiente de área verde. Dos espécimes coletados, 81,4% eram machos e 18,6% fêmeas. Os machos de *Lu. longipalpis* corresponderam a 67,5% do total coletado, enquanto as fêmeas responderam por 9,4%.

Tabela II: Número e frequência de flebotomíneos coletados, por sexo e por área, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Espécies	Total de espécimes coletados por sexo (%)		Total de espécimes coletados por área (%)		Total (%)
	♀	♂	Peridomicílio	Área verde	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	5 (0,5)	-	5 (0,5)	5 (0,5)
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	13 (1,2)	10 (0,9)	3 (0,3)	20 (1,9)	23 (2,2)
<i>Lutzomyia bacula</i>	1 (0,1)	-	-	1 (0,1)	1 (0,1)
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	1 (0,1)	1 (0,1)	1 (0,1)	1 (0,1)	2 (0,2)
<i>Lutzomyia christenseni</i>	2 (0,2)	-	-	2 (0,2)	2 (0,2)
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	1 (0,1)	13 (1,2)	14 (1,3)	-	14 (1,3)
<i>Lutzomyia intermedia</i>	-	4 (0,4)	-	4 (0,4)	4 (0,4)
<i>Lutzomyia lenti</i>	27 (2,5)	61 (5,7)	4 (0,4)	84 (7,9)	88 (8,3)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	100 (9,4)	718 (67,5)	812 (76,3)	6 (0,6)	818 (76,9)
<i>Lutzomyia lutziana</i>	2 (0,2)	2 (0,2)	1 (0,1)	3 (0,3)	4 (0,4)
<i>Lutzomyia migonei</i>	1 (0,1)	-	-	1 (0,1)	1 (0,1)
<i>Lutzomyia monticola</i>	4 (0,4)	2 (0,2)	3 (0,3)	3 (0,3)	6 (0,6)
<i>Lutzomyia neivai</i>	3 (0,3)	5 (0,5)	1 (0,1)	7 (0,7)	8 (0,8)
<i>Lutzomyia sallesi</i>	23 (2,2)	7 (0,7)	28 (2,6)	2 (0,2)	30 (2,8)
<i>Lutzomyia sordellii</i>	2 (0,2)	2 (0,2)	3 (0,3)	1 (0,1)	4 (0,4)
<i>Lutzomyia pessoai</i>	-	1 (0,1)	1 (0,1)	-	1 (0,1)
<i>Lutzomyia whitmani</i>	18 (1,7)	35 (3,3)	20 (1,9)	33 (3,1)	53 (5,0)
Total (%)	198 (18,6)	866 (81,4)	891 (83,7)	173 (16,3)	1064 (100)

De acordo com a tabela III as cinco espécies mais coletadas nas áreas de estudo foram: *Lu. longipalpis*, sendo 76,3% dos espécimes coletados no peridomicílio e 0,6% em áreas verdes, *Lu. lenti*, 0,4% coletados no peridomicílio e 7,9% em áreas verdes, *Lu. whitmani*, 1,9% dos espécimes coletados no peridomicílio e 3,1% em áreas verdes, *Lu. sallesi*, 2,6% coletados no peridomicílio e 0,2% em área verde e *Lu. aragaoi*, 0,3% dos espécimes coletados no peridomicílio e 1,9% em área verde. Esta diferença nas proporções de ocorrências para os ambientes de peridomicílio e áreas verdes das espécies citadas na tabela III, é estatisticamente significativa (p-valor <0,0001).

Tabela III: Porcentagem de espécies de flebotomíneos mais frequentes coletados: Peridomicílio e área verde, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro 2010 a agosto de 2011.

Áreas	<i>Lu. aragaoi</i>	<i>Lu. lenti</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Lu. sallesi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	Espécies
Peridomicílio	0,3	0,4	76,3	2,6	1,9	2,3
Área verde	1,9	7,9	0,6	0,2	3,1	2,5
Total	2,2	8,3	76,9	2,8	5	4,8

P-valor < 0.0001 – Teste Qui-quadrado

A relação entre espécimes machos e fêmeas nos dois locais de estudo (Peridomicílio e Área Verde) estão representados nas figuras 8 e 9. Houve predominância de machos no peridomicílio. Do total de 891 indivíduos coletados no peridomicílio, 752 (84%) eram machos (Figura 8). Os machos de *Lu. longipalpis* representaram 80% dos flebotomíneos coletados no peridomicílio.

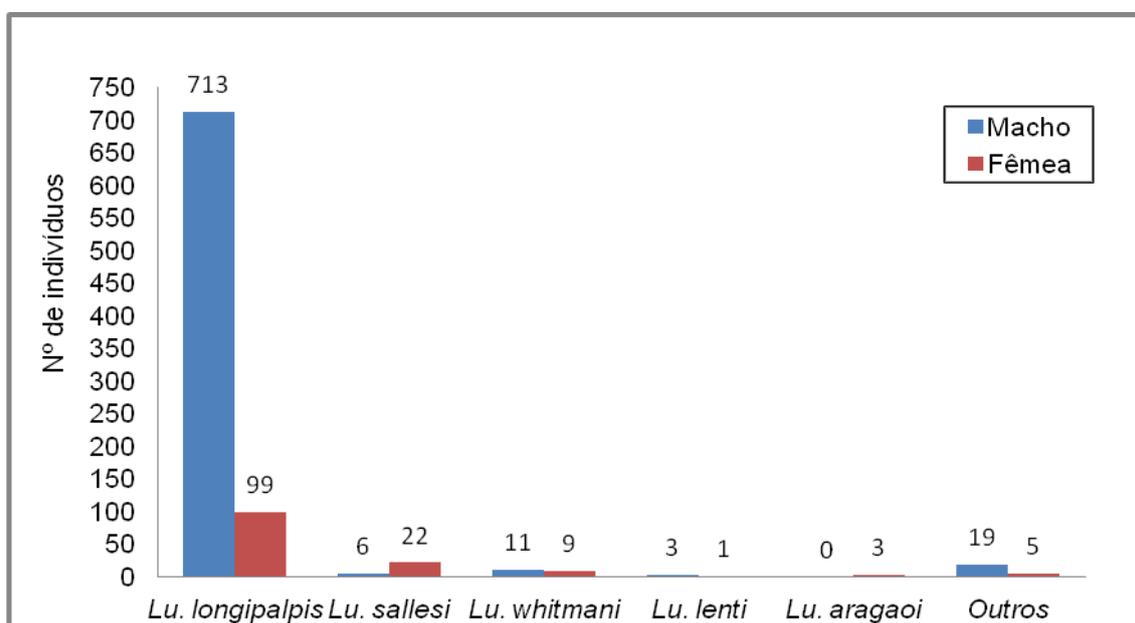


Figura 7: Número de flebotomíneos coletados por sexo no ambiente peridomiciliar, município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Em relação ao ambiente de área verde, a figura 9 nos aponta também uma predominância de flebotomíneos machos. Do total de 173 flebotomíneos coletados, 114 (66%) eram machos. E os machos de *Lu. lenti* representaram 33,5% dos flebotomíneos coletados em área verde.

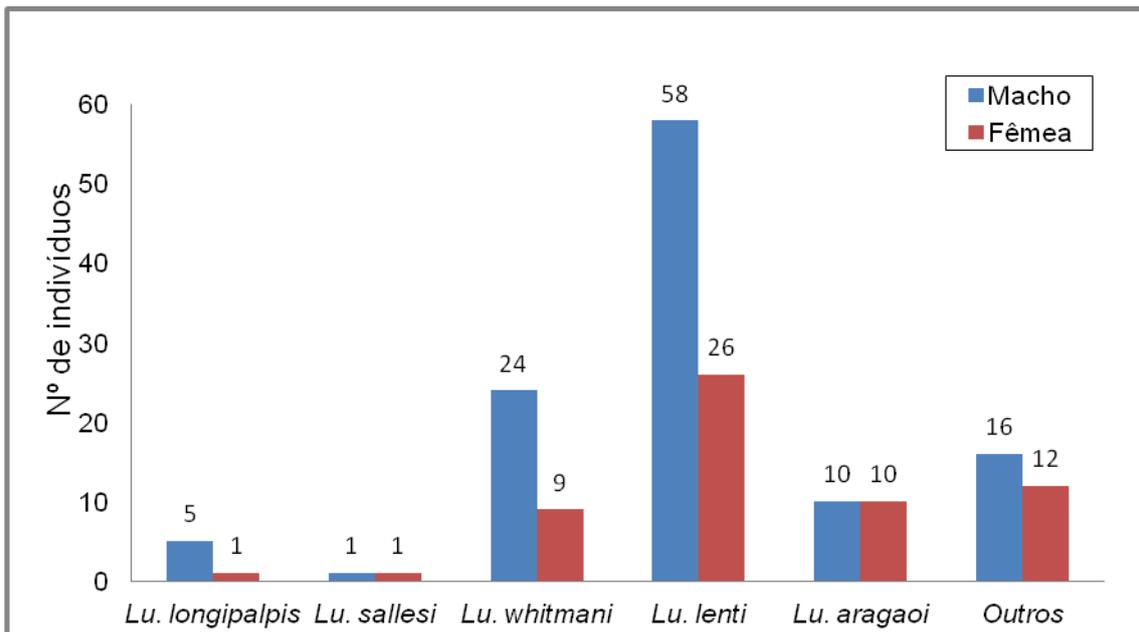


Figura 8: Número de flebotomíneos coletados por sexo em ambiente de área verde, município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Nenhuma das espécies foi encontrada em todas as localidades de estudo. A espécie *Lu. longipalpis* foi encontrada em 14 das 20 localidades. E as espécies *Br. brumpti*, *Lu. bacula*, *Lu. christenseni*, *Lu. intermedia* e *Lu. pessoai* foram encontradas em apenas uma das localidades (Tabela IV).

No peridomicílio, a casa 07 (Bairro Icarai) apresentou o maior número de espécimes coletados (Figura 10) e a casa 05 (Bairro Serra Verde) apresentou apenas um indivíduo coletado. E no ambiente de área verde, a Mata da Antena foi o local com maior número de flebotomíneos coletados, enquanto o Parque da Ilha foi o local com menor número de exemplares coletados.

Tabela IV: Número de flebotomíneos coletados, segundo espécie, sexo e local no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Espécies	Locais de coletas																			
	01- Jardim Alterosa		02- São José		03- Ipiranga		04- Serra Verde		05- Serra Verde		06- Oliveiras		07- Icaraí		08- Icaraí		09- Manoel Valinhas		10- Manoel Valinhas	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. aragaoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. bacula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. braziliensis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. christenseni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. cortelezzii</i>	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-
<i>Lu. intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. lenti</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. longipalpis</i>	-	-	-	1	8	1	-	1	-	-	2	-	619	70	1	2	25	-	14	10
<i>Lu. lutziana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. migonei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. monticola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. neivai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. sallesi</i>	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	2	2	2	1	-	-	-	-	3
<i>Lu. sordelli</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Lu. pessoai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. whitmani</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	1	2	5	2	1	1	-	-	-
Sub-Total	1	1	2	1	9	4	1	2	0	1	7	9	628	77	4	3	26	0	18	13
Total	2		3		13		3		1		16		705		7		26		29	
%	0,19		0,28		1,22		0,28		0,09		1,50		66,26		0,66		2,44		2,73	
Casos	LT		LT		LT		LT		LT		LT		LT		LT		LV		LT	

Continua

Tabela IV: continuação

Espécies	Locais de coletas																				Total									
	11- Espírito Santo		12- Niterói		13- Niterói		14- Maria Helena		15- Quinta da Palmeiras		Área Verde Antena		Área Verde Gafanhoto		Área Verde Ilha		Área Verde Noé		Área Verde Sidil											
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀										
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5									
<i>Lu. aragaoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	6	9	1	-	1	-	-	-	23									
<i>Lu. bacula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1									
<i>Lu. braziliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2									
<i>Lu. christenseni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2									
<i>Lu. cortelezzii</i>	-	-	1	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14									
<i>Lu. intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	4									
<i>Lu. lenti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	17	-	-	-	-	14	9	1	-	88									
<i>Lu. longipalpis</i>	5	1	4	5	8	6	27	2	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2	1	818										
<i>Lu. lutziana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	4										
<i>Lu. migonei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2									
<i>Lu. monticola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	5									
<i>Lu. neivai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	-	-	8									
<i>Lu. sallesi</i>	-	-	2	4	-	6	-	-	-	3	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	30									
<i>Lu. sordellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4									
<i>Lu. pessoai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1									
<i>Lu. whitmani</i>	-	-	-	-	-	-	3	1	1	-	2	-	1	-	1	1	14	6	6	2	53									
Sub-Total	5	1	7	9	13	13	30	4	1	3	47	20	14	12	10	4	34	17	9	6	1064									
Total	6		16		26		34		4		67		26		14		51		15		1064									
%	0,56		1,50		2,44		3,20		0,38		6,30		2,44		1,32		4,79		1,41		100,00									
Casos	LV		LV		LV		LV		LT																					

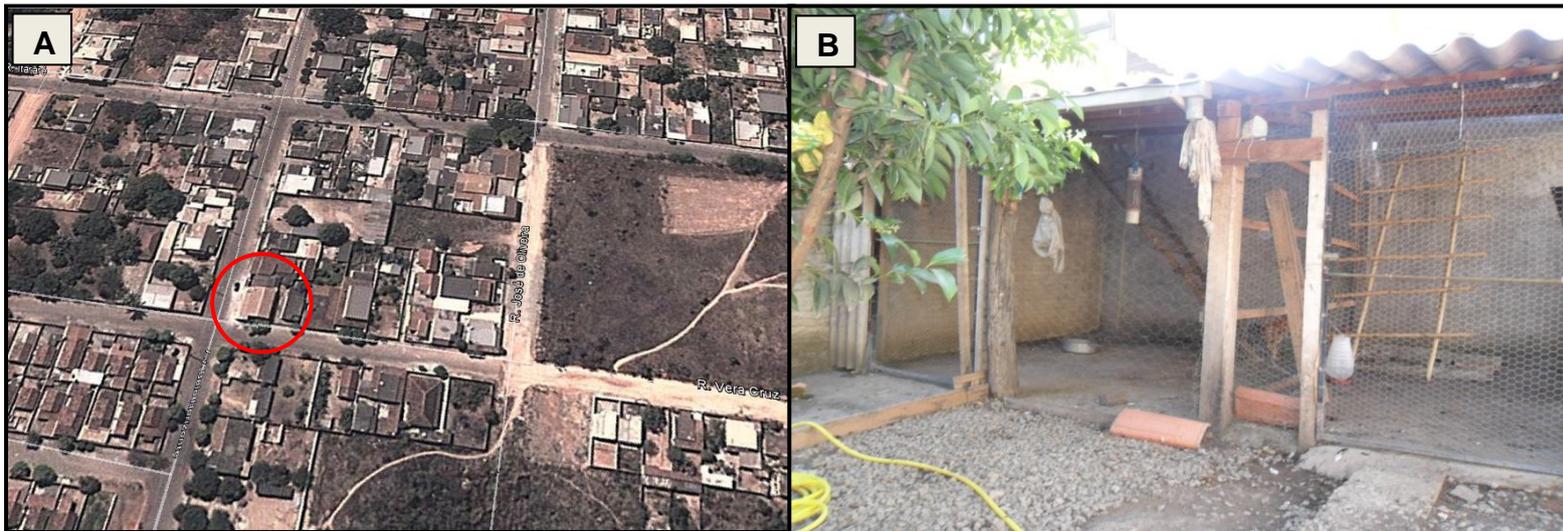


Figura 9: **A** – Vista Geral do bairro Icaraí, município de Divinópolis, evidenciando a casa 07 (círculo); **B** – Aspecto do peridomicílio pertencente a casa 07 onde se instalou armadilha luminosa do tipo HP.

Na tabela V estão distribuídos os flebotomíneos coletados por espécie, sexo e mês. As espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* foram as únicas coletadas em todos os meses de estudo. A espécie *Lu. bacula* foi coletada apenas no mês de outubro, *Lu. migonei* apenas em setembro e *Lu. pessoai* apenas em junho. As demais espécies foram coletadas pelo menos em dois meses.

Os meses que apresentaram as maiores porcentagens de coleta, durante o ano de estudo, foram abril (14,5%) e maio (15,6%). E os meses com menor número de indivíduos coletados foram julho (2,0%) e agosto (1,8%).

Tabela V: Número de flebotomíneos coletados com armadilha luminosa tipo HP, por espécie, sexo e mês, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Ano	Meses	Espécies de Flebotomíneos																	
		<i>Br. brumpti</i>		<i>Lu. aragaoi</i>		<i>Lu. bacula</i>		<i>Lu. braziliensis</i>		<i>Lu. christensemi</i>		<i>Lu. cortezezzii</i>		<i>Lu. intermedia</i>		<i>Lu. lenti</i>		<i>Lu. longipalpis</i>	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
2010	Set	4	-	5	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	47	22	6	2
	Out	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	-	-	13	4	37	4
	Nov	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	87	27
	Dez	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	10
2011	Jan	-	-	3	3	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	85	2
	Fev	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71	18
	Mar	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	92	8
	Abr	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	120	18
	Mai	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	4	-	1	-	-	-	135	9
	Jun	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	37	1
	Jul	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	1
	Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	13	-
	Total	5	0	10	13	0	1	1	1	0	2	13	1	4	0	61	27	718	100
	%	0,5	0,0	0,9	1,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	1,2	0,1	0,4	0,0	5,7	2,5	67,5	9,4

Continua

Tabela V: continuação

		Espécies de Flebotomíneos																	
		<i>Lu. Lutziana</i>		<i>Lu. migonei</i>		<i>Lu. monticola</i>		<i>Lu. neivai</i>		<i>Lu. sallesi</i>		<i>Lu. sordellii</i>		<i>Lu. pessoai</i>		<i>Lu. whitmani</i>		Total	%
Ano	Meses	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2010	Set	-	-	-	1	2	-	3	-	-	2	-	1	-	-	6	5	109	10,2
	Out	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	2	-	68	6,4
	Nov	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	-	-	-	1	-	123	11,6
	Dez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1	33	3,1
2011	Jan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	4	-	101	9,5
	Fev	-	2	-	-	-	-	1	-	3	2	-	-	-	-	2	-	101	9,5
	Mar	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	3	1	110	10,3
	Abr	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	1	-	-	-	1	3	154	14,5
	Mai	-	-	-	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	-	4	3	166	15,6
	Jun	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	9	4	59	5,5
	Jul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	21	2,0
	Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1	1	19	1,8
Total		2	2	0	1	2	4	5	3	7	23	2	2	1	0	35	18	1064	100
%		0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,3	0,7	2,2	0,2	0,2	0,1	0,0	3,3	1,7	100	

A figura 10 apresenta o número de flebotomíneos coletados em comparação aos parâmetros climáticos: temperatura, umidade relativa do ar e precipitação.

Podemos observar que as semanas de coleta que apresentaram as maiores médias de temperatura foram referentes a fevereiro (27,7 °C) e abril (26,2 °C), enquanto maio (19,1 °C) e julho (20,1 °C) apresentaram as menores médias na semana de coleta. As maiores porcentagens de umidade relativa do ar foram observadas nos meses de janeiro (77,4%) e junho (77,5%). E as menores porcentagens de umidade relativa do ar foram observadas em setembro (63,4%) e dezembro (60,5%). Quanto a precipitação, dezembro (20 mm³) e janeiro (16,4 mm³) foram os meses com a maior média durante a semana de coleta. Setembro, julho e agosto não apresentaram precipitação.

Considerando-se a sazonalidade dos flebotomíneos, observamos que a espécie *Lu. longipalpis* representou majoritariamente em número de indivíduos em 11 dos 12 meses pesquisados. O mês que ocorreu maior número de indivíduos coletados foi maio, coincidindo com a menor temperatura registrada no período do estudo. A ocorrência de menor número de flebotomíneos coincidiu com o mês de dezembro, o qual houve uma média de precipitação elevada, uma umidade relativa do ar mais baixa e temperaturas altas.

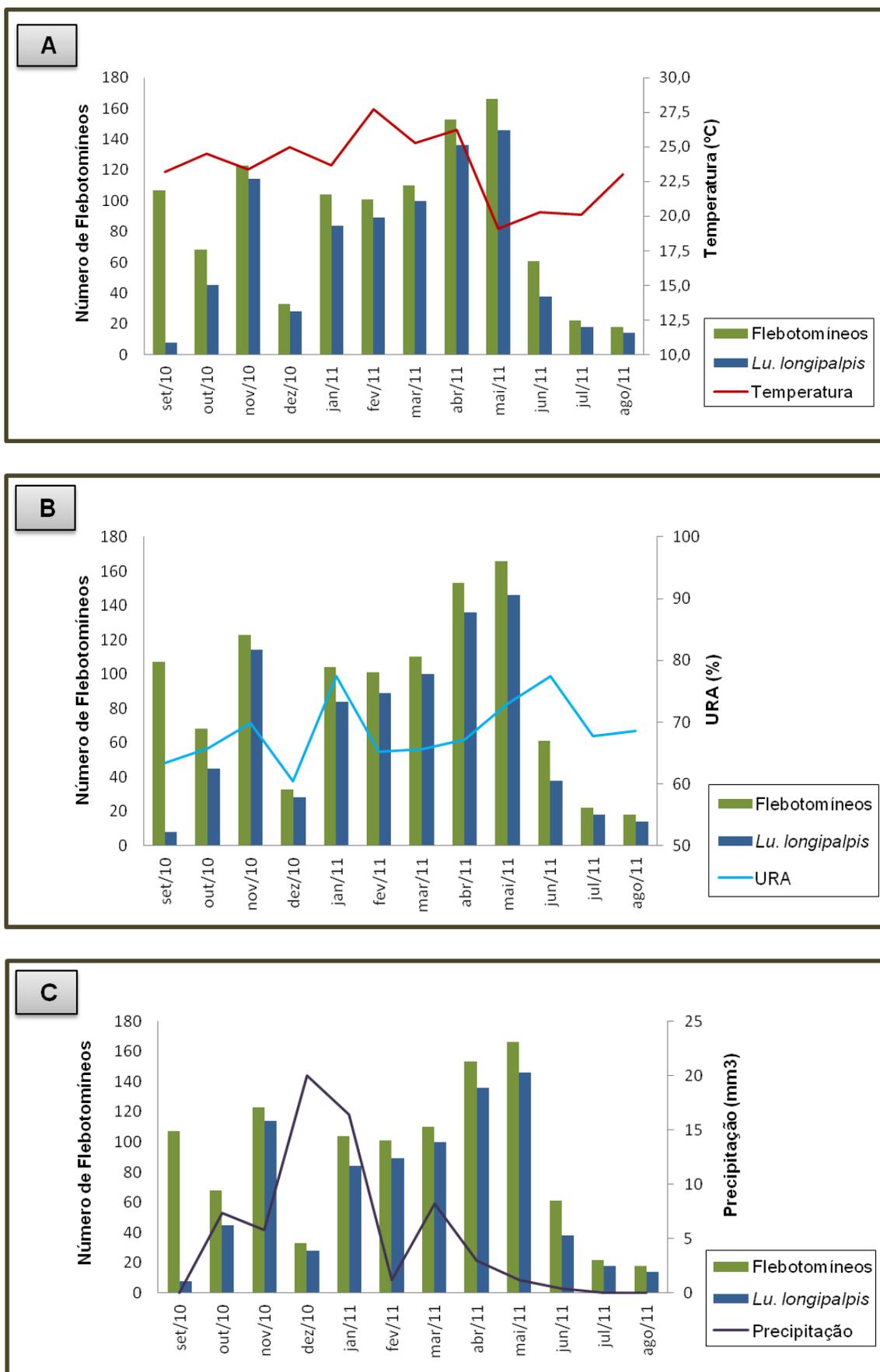


Figura 10: Número de flebotomíneos em relação à média dos dados climáticos da semana de cada coleta. A: temperatura (°C), B: umidade relativa do ar (%) e C: precipitação (mm³) no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

No presente estudo não foram observadas correlações significativas, considerando um nível de significância de 5%, entre as variáveis independentes (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) e a variável dependente (flebotomíneos) (Tabela VI).

Tabela VI: Resultado do teste de correlação entre o total de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas na semana de coleta, no município de Divinópolis, MG, Brasil, no período de setembro de 2010 a agosto de 2011.

Total de Flebotomíneos Coletados	Temperatura (média)	Pluviosidade (média)	Umidade relativa do ar (média)	
	0,01411	0,009999	0,03619	Coefficiente de Pearson
	0,7131	0,7572	0,5537	Valor de P

5.1.2 Coletas com armadilhas de Shannon

Foram coletados 24 espécimes de flebotomíneos com armadilha de Shannon. E apenas as espécies *Lu. amarali*, *Lu. cortelezzii*, *Lu. pessoai* e *Lu. whitmani* foram encontradas. O resultado total destas coletas estão representados nas tabelas VII e VIII.

A coleta do mês de março de 2012 na Mata do Noé foi responsável pela quase totalidade dos exemplares coletados, 19 espécimes de *Lu. whitmani*, um de *Lu. amarali* e um de *Lu. pessoai*. Na Mata do Sidil, realizada na mesma época, foi coletado um espécime de *Lu. cortelezzii*. No Parque da Ilha (dezembro de 2010) e no Parque do Gafanhoto (junho de 2011) houve a coleta de apenas um exemplar de *Lu. whitmani* em cada área verde. A espécie *Lu. amarali* foi encontrada apenas em coletas de Shannon, não sido observada nas coletas com armadilhas luminosas HP.

Tabela VII: Número de flebotomíneos coletados com armadilhas de Shannon, segundo mês, ano e local de coleta no município de Divinópolis.

Mês/Ano	Local de coleta	Número de espécimes coletados
dez/10	Parque da Ilha	1
jun/11	Parque do Gafanhoto	1
mar/12	Mata do Noé	21
mar/12	Mata do Sidil	1
Total		24

Tabela VIII: Flebotomíneos coletados com armadilha de Shannon por espécie e sexo, no município de Divinópolis, no período de dezembro de 2010 a março de 2012.

Espécies coletadas	Número de espécimes coletados por sexo		
	Machos	Fêmeas	Total
<i>Lu. amarali</i>	-	1	1
<i>Lu. cortelezzii</i>	1	-	1
<i>Lu. pessoai</i>	1	-	1
<i>Lu. whitmani</i>	10	11	21
Total	12	12	24

5.2 Resultado da PCR – *ITS1* para espécime de *Lu. longipalpis* naturalmente infectado

Do total de 198 fêmeas coletadas em armadilhas luminosas HP, 44 estavam ingurgitadas. As fêmeas ingurgitadas serão analisadas posteriormente para identificação do último repasto sanguíneo.

As amostras de fêmeas não ingurgitadas, 154 exemplares, foram submetidas à extração de DNA e a reações de PCR para o alvo *ITS1*. A amplificação de produtos característicos de *Leishmania* sp. (350pb) foi observada na amostra 87, conforme a figura 11. As demais amostras não apresentaram produto amplificado.

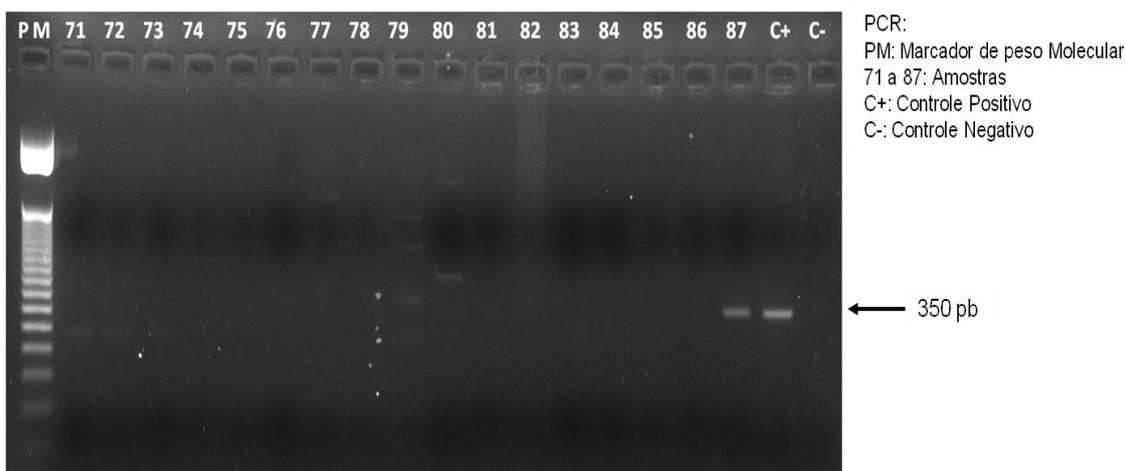


Figura 11: Gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos da reação de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de *Leishmania* sp. Observar amostra positiva de número 87.

Para a confirmação dos resultados, repetimos a amplificação e a eletroforese das amostras 71, 72, 77, 79, 80 e 87 (Figura 12), confirmando a presença de banda característica de *Leishmania* sp. apenas na amostra 87 (350pb).

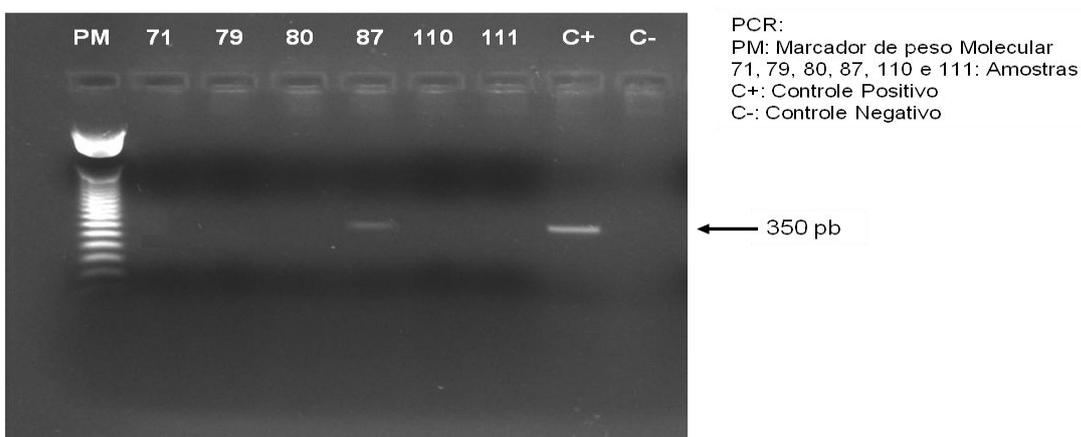


Figura 12: Gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos da reação de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de *Leishmania* sp.

A amostra positiva apresentou resultado conflitante ao realizar a reação de PCR-RFLP, uma vez que a digestão pela enzima *Hae* III não apresentou perfil para realizar a caracterização da espécie.

5.3 Sequenciamento

Para a identificação da espécie de *Leishmania* na amostra 87, utilizou-se a técnica do sequenciamento genético (Figura 13). Tal amostra teve um alinhamento de 99% com *Le. infantum*, apresentando um valor de erro $3e-104$, cuja referência no GenBank é: M81429.1. Esta técnica permitiu caracterizar a espécie *Le. infantum* na fêmea de *Lu. longipalpis* infectada.

Leishmania infantum strain K1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|EU825208.1](#) Length: 602 Number of Matches: 1

► [See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 241 to 451 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
387 bits(209)	3e-104	210/211(99%)	0/211(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTTCGATCTCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTTGAAGAATGCCTTCGCT			60
Sbjct 451	CTTCGATCTCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTTGAAGAATGCCTTCGCT			392
Query 61	GTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTCTGACGCCCCAGTACGTCTCCCCC			120
Sbjct 391	GTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTCTGACGCCCCAGTACGTCTCCCCC			332
Query 121	GAACTACCCTCCTTCATTCTAGAGGCCGTGAGTTGAAAAGGCGTTACGGCCGGACGAAC			180
Sbjct 331	GAACTACCCTCCTTCATTCTAGAGGCCGTGAGTTGAAAAGGCGTTACGGCCGGACGAAC			272
Query 181	CGGAGCTCGYACCGGACGCACTAAACCCCTC		211	
Sbjct 271	CGGAGCTCGTACCGGACGCACTAAACCCCTC		241	

Figura 13: Alinhamento da sequência do fragmento do gene SSUrRNA de espécie de *Leishmania*, depositada no GenBank.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças extremamente complexas e, nas duas últimas décadas, um novo fator soma-se a esta complexidade, tornando as leishmanioses um desafio para a saúde pública mundial: a urbanização. Durante os últimos vinte anos ocorreu um aumento no número de casos de todas as formas de leishmanioses no mundo, sendo que alguns especialistas as consideram como doenças emergentes em algumas áreas, e reemergentes em outras (Ashford, 2000).

A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida através da ecologia dos flebotomíneos. Os ciclos de vidas dos insetos vetores desempenham um papel fundamental na epidemiologia das doenças por eles transmitidas e diversos parâmetros podem afetar a taxa de transmissão de patógenos tais como fecundidade, mortalidade, migração e variação genética (Black & Moore, 2005).

Dezoito espécies de flebotomíneos foram coletadas na área de estudo, o que representa alta riqueza de espécies quando comparados aos resultados encontrados em outras áreas urbanas endêmicas para leishmaniose no Estado de Minas Gerais. Por exemplo, nove espécies de flebotomíneos foram coletados em um estudo realizado na cidade de Belo Horizonte e sete espécies foram coletadas na cidade de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte (Carvalho *et al.*, 2010; Saraiva *et al.*, 2011). Andrade Filho *et al* (2008) e Margonari *et al* (2010), utilizando metodologias de coletas diferentes, encontraram cinco e 21 espécies de flebotomíneos, respectivamente, no município de Divinópolis. Em nosso trabalho registramos pela primeira vez no município as espécies *Lu. intermedia* e *Lu. migonei*.

A razão de sexo representou 80,7% dos machos e 19,3% das fêmeas. Barata *et al* (2005), Loiola *et al* (2007), Dorval *et al* (2009) e Almeida *et al* (2010) encontraram resultados semelhantes, com a presença predominante de flebotomíneos machos nas coletas realizadas.

Das 18 espécies coletadas, a principal vetora de *Le. infantum*, *Lu. longipalpis*, foi a espécie mais abundante. As espécies *Lu. intermedia*, *Lu. neivai*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* foram coletados em menor quantidade, mas todas elas estão relacionadas com a transmissão de *Le. braziliensis* (Pita-Pereira *et al.*, 2005; Andrade Filho *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007).

A abundância e frequência de *Lu. longipalpis* em área urbana encontradas no estudo são similares a diversos outros estudos, como Rebêlo *et al* (1999) no Maranhão, Ximenes *et al* (1999) no Rio Grande do Norte, Andrade Filho *et al* (2001) em Tocantins, Oliveira *et al* (2003) no Mato Grosso do Sul, Barata *et al* (2005) em Minas Gerais, Souza *et al* (2007) no Ceará, o que demonstra a capacidade desta espécie em ocupar áreas urbanas.

A adaptabilidade de *Lu. longipalpis* ao ambiente urbano é investigada desde a década de 1930, quando o ciclo da LV começou a ser elucidado (Lainson & Rangel, 2005). Esta adaptabilidade é um dos principais determinantes do processo de urbanização da LV nas Américas (Lainson, 1989; Lainson & Rangel, 2005; Shaw, 2003). A distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla, estendendo-se desde o México até a Argentina (Lainson & Rangel, 2005; Nascimento *et al.*, 2007).

Segundo Melo (2008), dentre todas as espécies de flebotomíneos comumente incriminadas como vetoras de *Leishmania*, nenhuma é tão bem adaptada ao ambiente antropizado quanto a *Lu. longipalpis*. Talvez um dos fatores que favoreça esta adaptabilidade seja o hábito alimentar eclético da espécie, que realiza repasto tanto em animais silvestres quanto domésticos, como cães, cavalos, vacas e galinhas, e no homem.

A espécie *Lu. longipalpis* em nosso estudo foi a mais abundante nas coletas com armadilhas luminosas HP, porém não foi encontrado em armadilhas de Shannon. Segundo Galati *et al* (2006) esta espécie é a mais abundante na captura com armadilhas luminosas e raramente é capturada em armadilha de Shannon.

Lu. longipalpis foi abundante no peridomicílio 76,3% (812), enquanto poucos espécimes foram coletados nas áreas verdes 0,6% (6). Segundo Soares & Turco (2003), a alta capacidade vetorial associada à antropofilia e ao seu encontro no peridomicílio, fazem dessa espécie, o flebotomíneo de maior importância médica nos ciclos de transmissão da LV.

Resende *et al* (2006), relataram *Lu. longipalpis* no intra e peridomicílio de 1997 a 1999 na cidade de Belo Horizonte. Neste estudo, *Lu. longipalpis* representou 69% do total de espécimes coletados. Resultado semelhante ao trabalho realizado por Souza *et al* (2004), também no município de Belo Horizonte, no período de 2001 a 2003, quando *Lu. longipalpis* representou 68% dos flebotomíneos coletados.

A distribuição peridoméstica de *Lu. longipalpis* pode ser justificada devido à presença de abrigos de animais, onde os flebotomíneos podem ser encontrados em abundância sobre hospedeiros como cães e galináceos (Lainson & Rangel, 2003; Ximenes *et al.*, 1999). É conhecido que existe uma correlação entre a densidade de *Lu. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie é frequentemente associada a presença de animais domésticos (Foratini, 1960; Sherlock & Guitton, 1969).

Considerando os locais avaliados no município de Divinópolis, é importante ressaltar que uma alta porcentagem dos espécimes de *Lu. longipalpis* (66,26%) foram coletados em uma única residência. O local utilizado para a exposição da armadilha luminosa era o interior de um galinheiro. Outros locais próximos a viveiros e canis em outras residências também foram colocados armadilhas, mas não houve um número expressivo de flebotomíneos coletados.

Apesar de galinhas domésticas não serem infectadas por *Leishmania* e não agirem como reservatórios do parasita, esses animais representam uma ligação importante na cadeia epidemiológica da LV, pois constituem uma fonte de atração e alimentação para as fêmeas de *Lu. longipalpis* (Alexander *et al.*, 2002). Segundo Barata *et al.* (2005), a busca por fontes de alimentação é uma resposta comportamental que afeta a reprodução e a densidade populacional das espécies de flebotomíneos.

A espécie *Lu. lenti* representou 8,1% (88 exemplares) dos flebotomíneos coletados, sendo a segunda espécie mais abundante. Este achado merece destaque tendo em vista o fato de que essa espécie já foi encontrada naturalmente infectado por promastigotas na cidade de Jacobina, estado da Bahia (Sherlock, 1996). A presença desta espécie foi recentemente associada ao registro de *Lu. longipalpis* no estado do Espírito Santo, e o encontro de *Lu. lenti* pode ser um indicador da presença da *Lu. longipalpis* (Pinto *et al.*, 2012).

Recentemente, foi registrada a ocorrência de *Lu. lenti* coletada no peridomicílio infectada por *Le. braziliensis* em Campo Grande, MS (Paiva *et al.*, 2010). E no município de Divinópolis também foi relatada a infecção natural de *Lu. lenti* com *Le. braziliensis* em um estudo utilizando técnicas de biologia molecular (Margonari *et al.*, 2010). É interessante mencionar que este estudo foi realizado no Parque Gafanhoto, uma das áreas verdes que fazem parte do presente estudo. Porém, nós não encontramos esta espécie no Parque do Gafanhoto durante os

meses de coleta. Podemos inferir tal resultado uma vez que Margonari *et al* (2010) realizaram o estudo supra citado durante dois anos utilizando seis armadilhas luminosas tipo HP por mês e 24 coletas, uma por mês, utilizando armadilha de Shannon. Em nosso estudo utilizamos duas armadilhas tipo HP por mês durante um ano e realizamos apenas uma coleta com armadilha de Shannon no Parque do Gafanhoto.

A espécie *Lu. sallesi* é comumente relatada no Estado de Minas Gerais (Carvalho *et al.*, 2009). Esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por *Le. infantum* (Saraiva *et al.*, 2009), e Mayrink *et al* (1979) já haviam observado exemplares da espécie infectadas com tripanosomatídeos na região leste do Estado de Minas Gerais (Martins *et al.*, 1978).

Neste trabalho 30 espécimes (2,8%) de *Lu. sallesi* foram coletados. Esta espécie pode estar envolvida em um ciclo silvestre ou rural da transmissão entre outros reservatórios/hospedeiros vertebrados. Não há registros da mesma picando a espécie humana. O complexo *cortelezzii* ao qual *Lu. sallesi* pertence é composto por quatro espécies de flebotomíneos: *Lu. Sallesi*, *Lu. Cortelezzii*, *Lu. corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989) e *Lu. spelunca* (Carvalho, Brazil, Sanguinette & Andrade Filho, 2011), sendo estas espécies similares morfológicamente, causando as vezes confusões no momento da identificação específica (Galati *et al.*, 1989; Carvalho *et al.*, 2011). Tal complexo apresenta espécies com grande potencial como vetores em Minas Gerais, fazendo-se assim necessário uma atenção maior a este achado no local de estudo (Carvalho *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2010).

Lu. cortelezzii foi coletado em número pequeno, apenas 14 exemplares (1,3%) no peridomicílio com armadilhas HP, e apenas um com armadilha de Shannon. No entanto, é necessário salientar a sua ocorrência, uma vez que Carvalho *et al* (2008), encontraram espécies infectadas por *Le. infantum* na região metropolitana de Belo Horizonte. Além disso, na cidade de Belo Horizonte uma fêmea do complexo *cortelezzii* foi encontrado infectado por *Le. braziliensis* (Saraiva *et al.*, 2010).

Embora os autores não possam incriminar *Lu. cortelezzii* como um vetor para a transmissão de *Leishmania*, não rejeitam a possibilidade desta espécie estar envolvida nos ciclos de LT e LV. Recentemente, esta espécie foi encontrada infectada com *Le. infantum* no Estado do Mato Grosso do Sul (Andrade *et al.*, 2011).

A espécie *Lu. aragaoi* representou 2,1% (23) dos flebotomíneos. A maior abundância ocorreu em áreas verdes e alguns espécimes em área peridomiciliar. Esta espécie já foi encontrada naturalmente infectada com *Leishmania* sp. por Margonari *et al* (2010).

Em nosso trabalho, 65% (15) espécimes de *Lu. aragaoi* (6 machos e 9 fêmeas) foram coletadas no Parque do Gafanhoto. Porém nossos exemplares não se apresentaram positivos para *Leishmania*.

A espécie *Lu. whitmani*, foi incriminada como vetora de LT pela primeira vez em 1941, quando Pessôa e Coutinho encontraram um exemplar infectado em São Paulo. É considerada importante vetora de *Le. braziliensis* no Brasil, e é encontrada em um grande número de áreas urbanizadas (Teodoro *et al.*, 1991; Queiroz *et al.*, 1994; Teodoro *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2011).

A espécie *Lu. whitmani* tem uma ampla distribuição geográfica e adaptabilidade a vários nichos ecológicos com populações que apresentam diferentes padrões de comportamento (Rangel *et al.*, 1996). Vários autores têm mostrado alta abundância de *Lu. whitmani* no peridomicílio, especialmente no Sudeste do Brasil (Brazil *et al.*, 2006). Ryan *et al* (1990), isolaram e caracterizaram espécimes de *Lu. whitmani* naturalmente infectados por *Le. braziliensis*. Carvalho *et al* (2008), encontraram *Lu. whitmani* naturalmente infectados por *Le. (Viannia)* sp. utilizando técnicas moleculares. Saraiva *et al* (2010) e Margonari *et al* (2010), também relataram infecção de *Lu. whitmani* por *Le. infantum* empregando métodos moleculares.

Em nosso trabalho 1,9% (20) espécimes de *Lu. whitmani* foram coletados no peridomicílio no município de Divinópolis. Este fato pode indicar uma tendência de urbanização da espécie. Segundo alguns autores, esta espécie apresenta um padrão de colonização peridomiciliar (Leonardo & Rebelo, 2004), no entanto, pesquisas recentes sugerem que esta espécie já esteja urbanizada (Souza *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Teodoro *et al.*, 2003; Saraiva *et al.*, 2011).

A espécie *Lu. intermedia* representou 0,4% (4) do total das amostras coletadas. Esta espécie foi coletada exclusivamente no ambiente de área verde (Parque da Ilha). A ocorrência de *Lu. intermedia* merece ser discutida, dada sua importância epidemiológica, especialmente na região Sudeste do Brasil (Andrade Filho *et al.*, 2007; Marcondes *et al.*, 1997). Lutz & Neiva (1912), registraram uma alta

freqüência da espécie *Lu. intermedia* em residências. Esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis* (Rangel *et al.*, 1986) e foi incriminada transmissora de *Le. braziliensis* em várias localidades do Brasil (Andrade Filho *et al.*, 2003; 2007; Gontijo *et al.*, 2002; 2005). Já Saraiva *et al* (2010) encontraram *Lu. intermedia* infectada com *Le. infantum* em Belo Horizonte.

A espécie *Lu. neivai* representou 0,7% (8) do total dos flebotomíneos coletados. Apenas um único espécime foi coletado na área urbana no presente estudo, sendo o restante coletado no Parque da Ilha. Esta espécie está relacionada à transmissão de *Le. braziliensis* no Brasil (Andrade Filho *et al.*, 2007). Saraiva *et al* (2009), relataram a infecção natural de *Lu. neivai* por *Le. infantum* no norte do estado de Minas Gerais, enquanto Margonari *et al* (2010), encontraram esta espécie naturalmente infectada por *Leishmania* sp. no Parque do Gafanhoto, município de Divinópolis.

As espécies *Lu. intermedia* e *Lu. neivai* apresentam comportamentos similares (Andrade Filho *et al.*, 2007). Em Minas Gerais *Lu. intermedia* ocorre nas regiões do Jequitinhonha, Vale do Rio Doce, Metalúrgica e Zona da Mata e *Lu. neivai* ocorre nas regiões do Triângulo Mineiro e Sul. Nas regiões do Alto São Francisco e Noroeste, as duas espécies são simpátricas (Marcondes *et al.*, 1998). Esta distribuição engloba a região estudada, uma vez que o município de Divinópolis está inserido na macro-região do Alto São Francisco.

Dois espécimes de *Lu. migonei* e de *Lu. pessoai* foram coletados neste estudo. Apesar da baixa abundância, é importante relatar que a primeira foi incriminada como vetor de *Le. braziliensis* e ocorre freqüentemente em focos de LT (Queiroz *et al.*, 1994; Pita-Pereira *et al.*, 2005; Rangel & Lainson, 2003; Saraiva *et al.*, 2006). A última espécie é antropofílica e apresenta alta densidade em regiões endêmicas para LT e já foi encontrada naturalmente infectada por formas promastigotas consideradas como *Leishmania* (Pessoa & Coutinho, 1940). Assim *Lu. pessoai* é suspeita de participar dos ciclos de transmissão da LT no Sudeste do Brasil, devido à sua alta densidade populacional, atração considerável pelo homem e presença no interior das casas em áreas endêmicas, o que foi relatado por Rangel & Lainson (2009) em São Paulo.

A presença de *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* foi observada em todos os meses de coleta no município de Divinópolis. Estes achados também foram observados na Amazônia Maranhense (Rebêlo *et al.*, 2001), na Ilha de São Luis-MA

(Rebêlo, 2001), no estado do Paraná (Luz *et al.*, 2000), em Porteirinha-MG (Barata *et al.*, 2004).

Souza *et al* (2004), observaram que *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* sofreram aumentos significativos nas populações após períodos chuvosos (março e abril) em uma área endêmica para LT e LV no estado de Minas Gerais. Este fato pode ser explicado por condições ambientais favoráveis dos microhabitats após as chuvas. Rebêlo (2001) mostrou que houve uma alta frequência de *Lu. longipalpis* durante todo o ano em um estudo realizado no Maranhão, com uma tendência crescente nos períodos chuvosos, em relação aos períodos de seca. Já Sherlock (1996), relatou uma elevada ocorrência de *Lu. longipalpis* em meses frios, quentes e chuvosos, o que demonstra a importância de se conhecer o perfil de sazonalidade de espécies vetoras em cada localidade.

Forattini (1960), estudou a variação sazonal de flebotomíneos e verificou que em meses quentes e úmidos (dezembro a fevereiro), o número de exemplares capturados foi maior, enquanto nos meses mais frios e secos (de junho a agosto), a densidade da população tornou-se consideravelmente reduzida. O mesmo perfil sazonal foi relatado por Barata *et al* (2004), no município de Porteirinha, Minas Gerais, área endêmica para a LT e LV.

O padrão de ocorrência sazonal das espécies de flebotomíneos em nosso estudo foi determinado basicamente pelos espécimes de *Lu. longipalpis* capturados. Picos de coleta foram observados após períodos de chuvas intensas e a abundância de flebotomíneos teve um aumento durante os meses seguintes (de janeiro a maio), com uma tendência à diminuição durante os meses mais frios e secos. O baixo número de espécimes coletados em dezembro pode ser explicado pelo fato de que os estágios imaturos de flebotomíneos não se desenvolvem em locais encharcados (Lainson, 1982).

Vale ressaltar que o estudo da sazonalidade só apresenta dados confiáveis e consistentes quando se tem uma investigação de, no mínimo, dois anos consecutivos, para comparação dos resultados, diminuindo-se a margem de erros proporcionados por anos atípicos (Dias *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho a correlação entre a densidade de insetos e as variáveis climáticas não foram significativas. Estes resultados corroboram com estudos realizados em Varzelândia-MG (Dias *et al.*, 2007) e em Belo Horizonte-MG (Souza *et al.*, 2004).

O efeito não significativo da temperatura na densidade de flebotomíneos foi observado em Porteirinha-MG por Barata *et al* (2004). Resende *et al* (2006) relataram aumento do número de flebotomíneos, principalmente de *Lu. longipalpis* quando ocorreu a combinação de altas médias de temperatura e ocorrência de chuvas regulares em Belo Horizonte. A associação entre a densidade de flebotomíneos com a ocorrência das primeiras chuvas e registro dos maiores valores de umidade relativa do ar foi observada por Resende *et al* (2006), Monteiro *et al* (2005), Barata *et al* (2004) e Oliveira *et al* (2003), justificada pelo ambiente favorável à emergência de formas aladas.

Os meses com maior densidade de flebotomíneos não coincidiram com o maior pico de temperatura, a umidade relativa do ar foi em torno de 69%, não sendo o maior valor e a precipitação se apresentou baixa nos meses de maiores coletas, em torno de 2 mm³. No entanto, além das variáveis climáticas analisadas, outros aspectos ambientais devem ser analisados como presença de vegetação, troncos de árvores e matéria orgânica no solo que representam possíveis abrigos e criadouros para o vetor (Camargo-Neves *et al.*, 2001).

Nas coletas não sistematizadas, apenas as espécies *Lu. amarali*, *Lu. cortelezzii*, *Lu. pessoai* e *Lu. whitmani* foram coletadas. Foi comprovado que apenas o uso de armadilha luminosa HP não possibilita a identificação da fauna flebotomínica em seus aspectos quantitativos e qualitativos (Azevedo *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003). Através dos resultados do presente trabalho, foi observado que a utilização da armadilha luminosa de Shannon possibilitou averiguar a presença de uma espécie que não foi coletada pela armadilha luminosa HP: *Lu. amarali*. Este fato demonstra que as armadilhas exercem efeito atrativo diferencial entre as espécies.

Nas coletas não sistematizadas não foi encontrada nenhuma forma flagelada utilizando a dissecação como método de verificação da infecção natural das fêmeas capturadas. Normalmente a taxa de infecção quando se utiliza esta metodologia é baixa, e muitas vezes os resultados são negativos (Gontijo *et al.*, 2002, Carvalho *et al.*, 2008).

A taxa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos relatada na maioria dos estudos é muito baixa, mesmo quando se utilizam técnicas moleculares. Já foi encontrada uma taxa de infecção natural de 2,6% no Mato Grosso do Sul (Nascimento *et al.*, 2007); 2,0% no estado do Rio de Janeiro (Pita-Pereira *et al.*, 2005), 1,5% na Bahia (Miranda *et al.*, 2002), 0,4% na Amazônia maranhense

(Oliveira-Pereira *et al.*, 2006); 0,3% no Rio Grande do Sul (Silva e Grunewald, 1999), 0,16% no Brasil Central (Galati *et al.*, 1996) e resultados negativos em Belo Horizonte-MG (Souza *et al.*, 2004). Em nosso estudo apenas um exemplar, de um total de 154 fêmeas de flebotomíneos analisadas, de *Lu. longipalpis* se apresentou positivo para *Le. infantum*, representando uma positividade de 0,6%.

A utilização de técnicas moleculares permite um aumento da sensibilidade e da especificidade da identificação do parasito, embora seja importante avaliar a padronização dos métodos utilizados na conservação da amostra e na extração do DNA (Paiva *et al.*, 2007). Margonari *et al.* (2010) no Parque do Gafanhoto, encontraram 39,6% de amostras positivas para *Leishmania*. Os autores utilizaram como alvo a região conservada dos minicírculos de kDNA da *Leishmania*, o qual é extremamente sensível (Volpini *et al.*, 2004). Em nosso estudo utilizamos reações de PCR para o alvo *ITS1*.

Ao realizar a reação de PCR-RFLP a amostra positiva apresentou resultado conflitante uma vez que a digestão pela enzima *Hae* III não apresentou perfil para realizar a caracterização da espécie do parasito. Assim, analisamos a amostra através da técnica de sequenciamento genético do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR – SSUrRNA. O sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes alvo tem sido realizado e utilizado junto com o alinhamento das sequências obtidas como uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a amplificação dos produtos da LnPCR – SSUrRNA e o sequenciamento deste produto amplificado mostraram-se eficazes em identificar o fragmento como correspondente à *Le. Infantum*.

O conhecimento dos reservatórios é importante para o efetivo controle das leishmanioses. A infecção natural do cão doméstico com *Le. infantum* é documentada em regiões com a transmissão rural e periurbana das leishmanioses visceral e tegumentar (Marzochi *et al.*, 1985; Falqueto *et al.*, 1986). A LVC se encontra bastante difundida no país e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência de LVC com a presença abundante do vetor (Vieira & Coelho, 1998).

Durante os anos de 2009 a 2012, amostras de sangue de 12.274 cães domiciliados e errantes do município de Divinópolis foram coletadas e analisadas para a presença de *Leishmania*, pelo Centro de Referência de Vigilância em Saúde

Ambiental (CREVISA/Divinópolis). Destas, 5,9% (723) apresentaram resultado positivo. A taxa de positividade canina variou de 2,93 a 14,18%, dependendo do ano pesquisado, com uma taxa média de 5,9%. Margonari *et al* (2012) realizaram um estudo em que demonstrou pela primeira vez, a ocorrência de *Le. infantum* em cães no município de Divinópolis, apontando assim para uma possível urbanização da doença.

A importância da infecção canina no contexto das leishmanioses é conferida por várias razões, como: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem vivendo no peridomicílio e domicílio, o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta às espécies de *Leishmania* (Killick-Kendrick *et al.*, 1997). Os cães são importantes reservatórios em vários focos periurbanos (Marzochi & Marzochi, 1994; Silva *et al.*, 2001) e foi demonstrado que a LVC precede a doença humana, sendo uma das responsáveis pelo avanço espacial e temporal dos casos humanos (Bettini & Gradoni, 1986; Lainson & Shaw, 1987; Dye *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2001; França-Silva *et al.*, 2005).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2007 a 2011, 12 casos humanos de LV e 21 casos humanos de LT foram notificados em Divinópolis. Com relação aos bairros onde foi realizado o estudo, foram notificados 11 casos de LT em nove bairros e com relação à LV foram notificados quatro casos em três bairros (SINAN/Epidemiologia). Segundo Margonari *et al* (2006) a transmissão da doença em humanos ocorre em áreas de alta prevalência de cães infectados e grande número de flebotomíneos.

O processo de expansão geográfica das leishmanioses conduz à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle. Basano & Camargo (2004) apontam que além das medidas antivetoriais e de um eficiente sistema de vigilância epidemiológica, a redução da transmissão está intimamente relacionada à melhoria das condições de vida da população. E esta problemática foge ao escopo técnico da área de saúde, representando atualmente mais um obstáculo na abordagem do controle de endemias (Basano & Camargo, 2004).

Em um estudo realizado por Margonari *et al* (2012), os autores demonstraram que o conhecimento público sobre as leishmanioses no município de Divinópolis é escasso e fragmentado dificultando o trabalho de agentes de saúde, uma vez que a população é uma grande aliada no processo de prevenção e controle de doenças.

A vigilância ambiental baseada em vetores artrópodes fornecem bases apropriadas para intervenções no controle de doenças. Indicadores delineados pela vigilância de vetores precisa considerar a diversidade da atividade enzoótica, a abundância das espécies e as suas taxas de infecção natural (Gomes, 2002). Em relação a estes aspectos, a importante presença de *Lu. longipalpis* e de espécies vetoras de *Le. braziliensis* salienta para a necessidade de elaborar uma intensiva vigilância entomológica visando a prevenção e controle da leishmaniose visceral e tegumentar no município de Divinópolis.

7 Conclusões

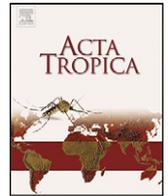
- 1- O município de Divinópolis/MG apresentou uma fauna bastante diversificada, evidenciando a presença 17 espécies do gênero *Lutzomyia* e uma espécie do gênero *Brumptomyia*;
- 2- A espécie mais prevalente foi *Lu. longipalpis*, importante espécie vetora de LV;
- 3- Nenhuma das espécies foi encontrada em todas as localidades de estudo, porém a espécie *Lu. longipalpis* foi encontrada em 14 das 20 localidades;
- 4- A espécie *Lu. longipalpis* apresentou preferência pelo ambiente peridomiciliar, sendo sua maioria capturada em uma única residência provavelmente atraídos por galináceos;
- 5- O ambiente de área verde apresentou uma riqueza de 15 espécies, enquanto no ambiente periurbano a riqueza foi de 12 espécies;
- 6- Não houve correlação significativa entre a densidade dos vetores e as variáveis bioclimáticas temperatura, umidade relativa do ar e precipitação;
- 7- A determinação da taxa mínima de infecção natural nas fêmeas de flebotomíneos na área estudada foi de aproximadamente 0,6%;
- 8- Os resultados do nosso estudo sobre os flebotomíneos podem contribuir para um melhor direcionamento das medidas de controle pelos órgãos competentes do município.

8 ANEXO

8.1 Artigo 1

Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil.

Autores: Bruno Warley Leandro Nascimento, Lara Saraiva, Rafael Gonçalves Teixeira Neto, Paula Cavalcante Lamy Serra e Meira, Cristiani de Castilho Sanguinette, Gabriel Barbosa Tonelli, Helbert Antônio Botelho, Vinícius Silva Belo, Eduardo Sérgio da Silva, Célia Maria Ferreira Gontijo, José Dilermando Andrade Filho.



Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil

Bruno Warlley Leandro Nascimento^a, Lara Saraiva^a, Rafael Gonçalves Teixeira Neto^a, Paula Cavalcante Lamy Serra e Meira^a, Cristiani de Castilho Sanguinette^a, Gabriel Barbosa Tonelli^a, Helbert Antônio Botelho^d, Vinícius Silva Belo^b, Eduardo Sérgio da Silva^c, Célia Maria Ferreira Gontijo^d, José Dilermando Andrade Filho^{a,*}

^a Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CP 1743, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Escola Nacional de Saúde Pública-ENSP/FIOCRUZ. CEP: 21041-210, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Universidade Federal de São João del Rei/Campus Dona Lindu. CEP: 35501-296. Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400 Chanadour, Divinópolis, MG, Brazil

^d Laboratório de Leishmanioses–Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2012

Received in revised form 30 October 2012

Accepted 11 November 2012

Available online 21 November 2012

Keywords:

Sand flies

Leishmaniasis

Lutzomyia longipalpis

Divinópolis city

ABSTRACT

The transmission of *Leishmania* involves several species of sand flies that are closely associated with various parasites and reservoirs, with differing transmission cycles in Brazil. A study on the phlebotomine species composition has been conducted in the municipality of Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, an endemic area for cutaneous leishmaniasis (CL), which has intense occurrence of visceral leishmaniasis (VL) cases. In order to study the sand flies populations and their seasonality, CDC light traps (HP model) were distributed in 15 houses which presented at least one case of CL or VL and in five urban parks (green areas). Collections were carried out three nights monthly from September 2010 to August 2011. A total of 1064 phlebotomine specimens were collected belonging to two genera and seventeen species: *Brumptomyia brumpti*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia cortelezii*, *Lutzomyia lenti*, *Lutzomyia sallesi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia christenseni*, *Lutzomyia monticola*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia aragaoi*, *Lutzomyia brasiliensis*, *Lutzomyia lutziana*, and *Lutzomyia sordellii*. *L. longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Brazil, was the most frequent species, accounting for 76.9% of the total, followed by *L. lenti* with 8.3%, this species is not a proven vector. Green and urban areas had different sand flies species composition, whereas the high abundance of *L. longipalpis* in urban areas and the presence of various vector species in both green and urban areas were also observed. Our data point out to the requirement of control measures against phlebotomine sand flies in the municipality of Divinópolis and adoption of strategies aiming entomological surveillance.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The leishmaniasis are the most severe and common sand fly-borne diseases. The phlebotomine sand flies are notorious vectors of human diseases caused by *Leishmania* (Young and Duncan, 1994). Over the last decade, the number of cases and the geographical spread of visceral and cutaneous leishmaniasis

has increased considerably within Brazil. Currently, the disease constitutes one of the most serious problems faced by the public health authorities (Brasil, 2006).

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease owing to its high mortality rate. VL presents peri-urban and urban patterns of occurrence in many Brazilian cities including Belo Horizonte, Campo Grande, São Luís, and Teresina (Silva et al., 2001; Felipe et al., 2011; Soares et al., 2011; Oliveira et al., 2012). Regarding about the 27 Brazilian states, 19 have reported autochthonous VL cases. Recently, the expansion of the disease has been observed in the Amazon basin as a result of human activities such as deforestation, establishment of field plantations, mining, and new settlements (Silva-Nunes et al., 2008).

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease with a range of etiological agents, reservoirs, vectors and transmission patterns. Comprehension about this zoonotic disease is still limited in certain

* Corresponding author Tel.: +55 31 3349 7756; fax: +55 31 3349 7795.

E-mail addresses: brunowarley@hotmail.com (B.W.L. Nascimento), delphinapteruslara@gmail.com (L. Saraiva), rafaelgtn@cpqrr.fiocruz.br (R.G.T. Neto), paula-lamy@hotmail.com (P.C.L.S.e. Meira), cristianics@hotmail.com (C.d.C. Sanguinette), tonelli.gabriel@gmail.com (G.B. Tonelli), helbert.bio@hotmail.com (H.A. Botelho), viniciusbelo4@hotmail.com (V.S. Belo), silvaedu@ufsj.edu.br (E.S.d. Silva), gontijo@cpqrr.fiocruz.br (C.M.F. Gontijo), jandrade@cpqrr.fiocruz.br (J.D.A. Filho).

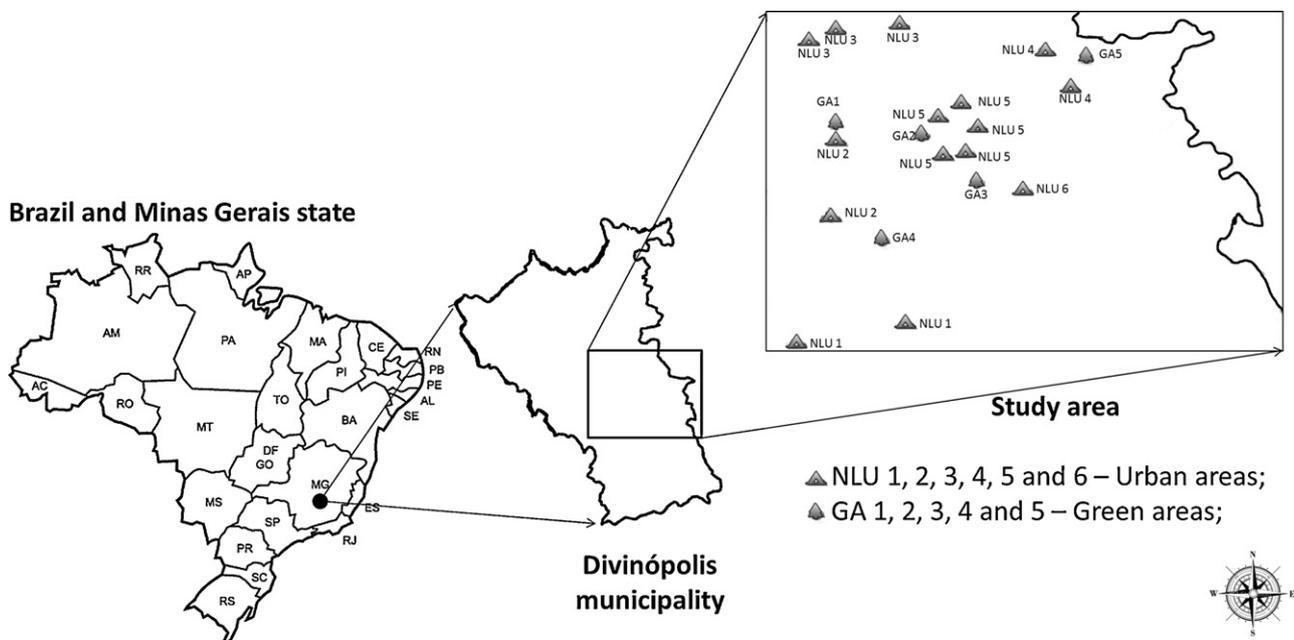


Fig. 1. Divinópolis municipality map, showing the collection places of sand flies – NLU 1 to NLU 6 – Urban localities, GA: Green areas—from September 2010 to August 2011.

aspects, which makes it difficult to control. World Health Organization considers CL one of the six most important infectious diseases due to its high detection rates and the potential to cause deformities in patients (World Health Organization, 2010).

The zoonosis is widely disseminated in Brazil, which reports cases in all regions. From 1985 to 2005, there was an average annual rate of 28,568 autochthonous cases recorded and a medium detection rate of 18.5 cases per 100,000 inhabitants (Brasil, 2007). The first records of CL cases in Minas Gerais state were associated to deforestation to construction of roads and to agricultural activities (Orsini, 1940). However the transmission of the disease in Minas Gerais has changed with outbreaks occurring in rural settlements and in peri-urban and urban areas, as in other Brazilian regions (Lainson, 1989; Brasil, 2007; Gontijo et al., 2002).

An important aspect of the leishmaniasis in Brazil is the adaptation of proven vectors of different species of *Leishmania* to urban areas of many municipalities. For instance *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), the main vector of *Leishmania infantum*, *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) vectors of *Leishmania braziliensis* are commonly collected in urban areas (Barata et al., 2005; Gontijo et al., 2005; Carvalho et al., 2009; Saraiva et al., 2011).

Divinópolis municipality is considered an endemic region of CL. In the 1990 decade 135 human cases of American cutaneous leishmaniasis were reported. From 2000 to 2011, 52 cases were recorded by Health Authorities (DEDCH, 2012). Considering the occurrence of VL in the municipality, four cases were registered in 2011. According to the classification of Ministry of Health in Brazil for areas to surveillance and control of visceral leishmaniasis, the Divinópolis is ranked as a moderated transmission area whereas the average number of VL human cases was between 2.4 and 4.4 cases in the last five years. Until now, 21 species of sand flies were reported in the municipality of Divinópolis (Andrade Filho et al., 2008; Margonari et al., 2010).

This classification indicates the necessity of epidemiological surveillance measures with respect to VL, once other cities in Minas Gerais state have had the same historical profile, currently are areas of intense transmission of VL, for instance Belo Horizonte and Santa Luzia municipalities (PBH, 2011).

Disorganized growth of Divinópolis can favor the proximity of suburban areas and areas of residual forest. This fact can promote the occurrence of transmission cycles of leishmaniasis. Nevertheless there are no concluded studies on the epidemiology of leishmaniasis in the municipality. As stated by Silva et al. (2001) several zoonoses have assumed increasing public health importance due to their urbanization. However these urban rates have increased without the incidence of the diseases being reduced in rural areas. Alterations in rural environments and the constant migratory movements of the population to the periphery of cities have facilitated this process.

The aim of this study was to provide information about the diversity, abundance and seasonality of sand flies vectors in the municipality, focusing the development of control measures well targeted and entomological surveillance.

2. Materials and methods

2.1. Study area

Divinópolis has 213,000 inhabitants in a total area of 708 km² (IBGE, 2011). The municipality coordinates are 20° 8'21''S e 44° 53'17''W, the altitude ranges from 600 to 850 m above sea level. Divinópolis is located in the metallurgical zone, in the region called “Alto São Francisco River” in Minas Gerais state, Brazil (Fig. 1). The municipality benefits from a humid subtropical climate (Cwa – Koppen climate classification), warm weather with a distinctly dry winter. The average annual temperature is 16 °C and an average rainfall varies from 1200 to 1700 mm/year. The average annual humidity of the air varies around 72%. The predominant vegetation in the municipality is the Brazilian Savannah called “Cerrado”. Main degradation factors in the area include the pastoral activity, due to the extensive cattle raising, and the urban occupation (SEPLAN/PMD, 1998).

2.2. Sample collection and identification of phlebotomines

Sampling was performed every month between September 2010 and August 2011, using CDC light traps, HP model (Pugedo et al., 2005) located in fifteen houses and in five green areas.

Table 1
Collected sand flies per species, sex and area of study (urban and green areas) in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Species	Total of collected specimens per sex (%)		Total of collected specimens per area (%)		Total (%)
	♀	♂	Urban	Green	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	–	5(0.5)	–	5(0.5)	5(0.5)
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	13(1.2)	10(0.9)	3(0.3)	20(1.9)	23(2.2)
<i>Lutzomyia bacula</i>	1(0.1)	–	–	1(0.1)	1(0.1)
<i>Lutzomyia braziliensis</i>	1(0.1)	1(0.1)	1(0.1)	1(0.1)	2(0.2)
<i>Lutzomyia christenseni</i>	2(0.2)	–	–	2(0.2)	2(0.2)
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	1(0.1)	13(1.2)	14(1.3)	–	14(1.3)
<i>Lutzomyia intermedia</i>	–	4(0.4)	–	4(0.4)	4(0.4)
<i>Lutzomyia lenti</i>	27(2.5)	61(5.7)	4(0.4)	84(7.9)	88(8.3)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	100(9.4)	718(67.5)	812(76.3)	6(0.6)	818(76.9)
<i>Lutzomyia lutziana</i>	2(0.2)	2(0.2)	1(0.1)	3(0.3)	4(0.4)
<i>Lutzomyia migonei</i>	1(0.1)	–	–	1(0.1)	1(0.1)
<i>Lutzomyia monticola</i>	4(0.4)	2(0.2)	3(0.3)	3(0.3)	6(0.6)
<i>Lutzomyia neivai</i>	3(0.3)	5(0.5)	1(0.1)	7(0.7)	8(0.8)
<i>Lutzomyia sallesi</i>	23(2.2)	7(0.7)	28(92.6)	2(0.2)	30(2.8)
<i>Lutzomyia sordelli</i>	2(0.2)	2(0.2)	3(0.3)	1(0.1)	4(0.4)
<i>Lutzomyia pessoai</i>	–	1(0.1)	1(0.1)	–	1(0.1)
<i>Lutzomyia whitmani</i>	18(1.7)	35(3.3)	20(1.9)	33(3.1)	53(5.0)
Total (%)	198(18.6)	866(81.4)	891(83.7)	173(16.3)	1064(100)

The sampling sites comprised 15 residences in which at least one human case of VL or CL was reported in 2009, and five segments of green areas located in the city, called urban parks.

The analyses were performed by grouping the urban sampling sites according to geographical proximity on six areas: NLU1 (two traps), NLU2 (two traps), NLU3 (three traps), NLU4 (two traps), NLU5 (five traps), NLU6 (one trap). Green areas were analyzed together (ten traps) (Fig. 1). This procedure has been made to enhance the analytical power. The comparison between the areas was carried out through the average number of collected sand flies specimens since the number of traps in each area was different.

A total of 25 traps were employed, with one trap in each residence and two in each green area. The traps were exposed between 6:00 p.m. and 06:00 a.m. during three nights of collection. Sampling time per trap was 432 h and the total sampling hours was 10,800. Trapped specimens were identified according to the classification proposed by Young and Duncan (1994).

2.3. Analyses

Data were organized through Excell 97/2003 which was used to the descriptive statistics. Graph Pad Prisma 4.0 was used for statistical analyses. The climatological data were obtained from the Health Secretary of Divinópolis Municipality.

3. Results

Phlebotomine specimens belonging to eight genera and seventeen species were collected and identified: sixteen species of *Lutzomyia* i.e. *Lutzomyia bacula* (Martins, Falcão & Silva, 1965), *Lutzomyia cortelezzii* (Brêthes, 1923), *Lutzomyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Lutzomyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939); *L. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926), *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lutzomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Lutzomyia monticola* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Lutzomyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia brasiliensis* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia migonei* (França, 1920) and *Lutzomyia sordelli* (Shannon e Del Ponte, 1927). Regarding the other genera, *Brumptomyia*, only one species of genus was collected. Respectively: *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), (Table 1).

A total of 1064 specimens were collected. Urban sites displayed a much higher abundance of phlebotomines than the green areas, respectively 83.7% and 16.3% of the total were collected in each area.

Lutzomyia longipalpis accounted for 76.9% of the total number of specimens collected, followed by *L. lenti* (8.3%), *L. whitmani* (5.0%), *L. sallesi* (2.8%) and *L. aragaoi* (2.2%). With regard to the ratio of genders 81.4% of the specimens were males and 18.6% were females (Table 1).

Green areas displayed a little higher specific richness of phlebotomines than the urban sites; 15 phlebotomine species were identified; 12 species were collected in urban sites (Table 1). From the total collected in urban areas (891 specimens), 91% (812 specimens) belong to *L. longipalpis* species. This species was mainly collected in urban areas 99.3% of specimens and only 0.7% were collected in green areas. It is important to point out that from the specimens of *L. longipalpis* collected in urban areas 85% come from a single house located in NLU4 (Table 2).

With respect to *L. lenti*, 95.5% (84) of specimens were collected in green areas and 4.5% (4) were collected in urban areas, while *L. whitmani*, 37.7% (20) of the specimens were collected in urban areas and 62.3% (33) in green areas. Some species were collected exclusively in the green areas: *B. brumpti*, *L. bacula*, *L. christenseni*, *L. intermedia*, *L. migonei*. The species *L. cortelezzii* e *L. pessoai* were recorded only in urban areas.

The six urban areas studied showed different patterns of richness and abundance of sand flies species. In the area NLU1, five species were collected with the predominance of *L. sallesi* although *L. longipalpis* was not found at this location.

In the areas NLU 2 and 4, six species were collected with the predominance of *L. longipalpis*. In the area NLU 4, *L. longipalpis* has reached the highest average of specimens collected among all locations of the study. The location NLU 3 had a richness of eight species with the predominance of *L. sallesi*. In the localities NLU 5 and 6, the richness was five and three species, respectively, and the predominant species was *L. longipalpis* in these two areas (Table 2).

Green areas had a richness of 15 species and the predominant ones were: *L. lenti*, *L. whitmani* and *L. aragaoi*, respectively (Table 2). Differences in the proportions of species collected in the two types of environment (urban and green areas) were statistically significant ($p < 0.0001$) (Table 3).

The curve representing the seasonal variation in the numbers of sand flies captured (Fig. 2) peaked in April and May 2011. *L. whitmani* and *L. longipalpis* were the only species collected in all months of the study, *L. sallesi* has not been collected only in July. The presence of a greater number of phlebotomines coincided with the periods during and after the rainfalls, which were characterized by higher relative humidity and milder temperatures.

Table 2
Average of collected specimens per light trap in each area of study in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Collected species	Places of collection													
	NLU1		NLU2		NLU3		NLU4		NLU5		NLU6		Green areas	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Lutzomyia bacula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia braziliensis</i>	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia christenseni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	-	-	-	1.5	-	-	-	1.5	0.2	1.4	-	-	-	-
<i>Lutzomyia intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8
<i>Lutzomyia lenti</i>	-	0.5	-	-	0.3	0.3	-	0.5	-	-	-	-	5.2	11.6
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	-	1	4	0.3	0.7	36	310	4.4	11.2	2	27	0.2	1
<i>Lutzomyia lutziana</i>	-	0.4	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia migonei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia monticola</i>	-	-	-	0.3	0.7	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.2
<i>Lutzomyia neivai</i>	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	--	0.6	0.8
<i>Lutzomyia sallesi</i>	1.5	-	0.5	-	1	0.3	1	1.5	2.6	0.4	-	-	0.2	0.2
<i>Lutzomyia sordelli</i>	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	1	0.2	-
<i>Lutzomyia pessoai</i>	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lutzomyia whitmani</i>	-	0.5	0.5	-	0.3	0.7	3	2	-	0.2	1	3	1.8	4.8

Table 3
Proportion of collected sand flies specimens per species and urban and green areas in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Studied areas	<i>L. lenti</i>	<i>L. sallesi</i>	<i>L. longipalpis</i>	<i>L. whitmani</i>	<i>L. aragaoi</i>	Other species
Urban areas	0.4	2.6	76.2	1.9	0.3	2.3
Green areas	7.9	0.2	0.6	3.1	1.9	2.6
Total	8.3	2.8	76.7	5.0	2.2	4.9

P-value < 0.0001, Chi-square test.

4. Discussion

Leishmaniasis are considered eco-epidemiological events extremely complex. Currently, urbanization adds up to this complexity, thus them represent a challenge to global public health. An increase in the number of cases of all forms of leishmaniasis occurred in the world over the past twenty years. Some experts consider them emerging diseases in some areas, and reemerging in others (Ashford, 2000).

Seventeen species of sand flies were collected in the studied area, which represent high species richness while compared to results found in other endemic urban areas for leishmaniasis in Minas Gerais State. For instance nine species of sand flies were collected in a study carried out in Belo Horizonte city and exclusively seven species were collected in the city of Santa Luzia (Carvalho et al., 2010; Saraiva et al., 2011).

From the 17 collected species, seven are proven or suspicious vectors of *Leishmania*. The main vector of *L. infantum*, *L. longipalpis*

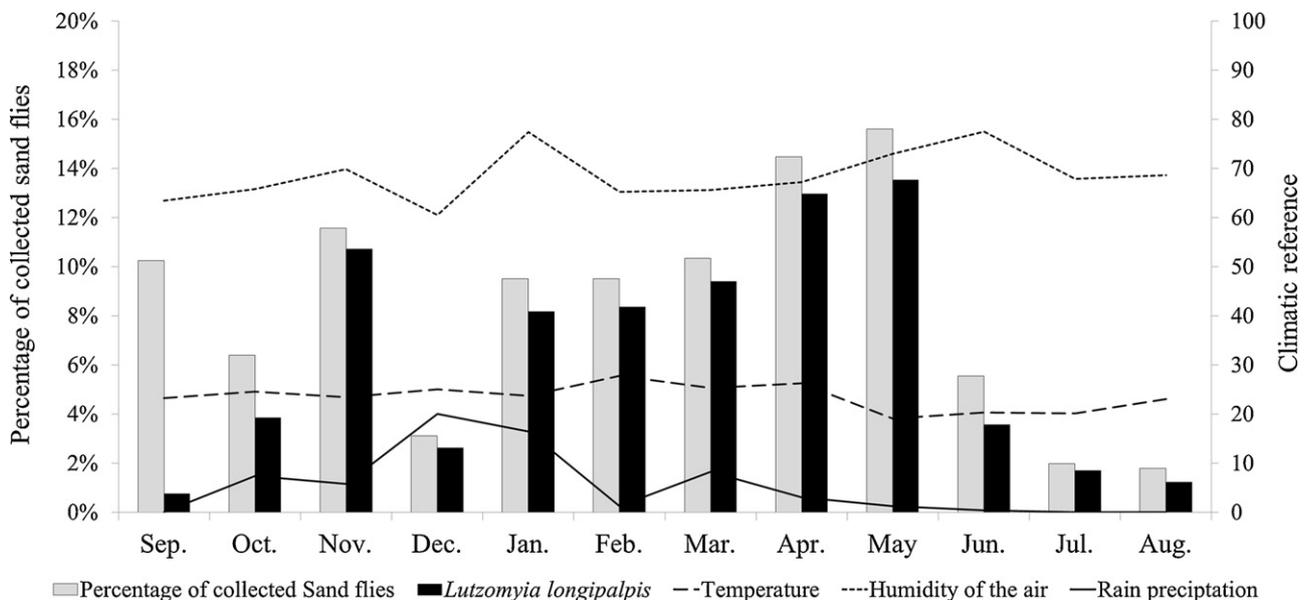


Fig. 2. Monthly amount of phlebotomine species captured in the Divinópolis municipality in comparison with the weekly mean of temperature, total rainfall and mean relative humidity of the air from September 2010 to August 2011.

was the most abundant species (76.9%). The species *L. intermedia* (0.4%), *L. neivai* (0.8%), *L. whitmani* (5.0%), and *L. migonei* (0.1%) were collected in small amount of numbers, all of them are related to the *L. braziliensis* transmission (Pita-Pereira et al., 2005; Andrade Filho et al., 2007; Costa et al., 2007).

Gender ratio represented 84.6% of males and 18.6% of females. These numbers can be understood considering the behavior of these insects during feeding and copulation. Males are active on searching for hosts. After finding them, the males release sexual pheromones which attract females (Brazil and Brazil, 2003).

The highest species richness has occurred in green areas (15 species), however, the highest abundance of specimens have occurred in the peridomiciles (83.7% of the total). This fact illustrates the adaptation of sand flies to anthropically modified environment, where some species are found in high abundance. The adaptability of *L. longipalpis* to the urban environment has been investigated since the decade of 1930, when the cycle of VL started to be elucidated. Presence of this species in peridomiciles and their opportunistic feeding habits were reported (Lainson and Rangel, 2005). One of the determinants of VL urbanization process in the Americas is the adaptability of this vector species to the anthropically modified environment (Lainson, 1989; Lainson and Rangel, 2005; Shaw et al., 2003).

Resende et al. (2006) reported *L. longipalpis* in the intra and peridomiciles from 1997 to 1999 in Belo Horizonte city. In this study, *L. longipalpis* represented 69% of the total collected specimens. Research conducted by Souza et al. (2004), also in Belo Horizonte city, from 2001 to 2003, *L. longipalpis* accounted for 68% of the collected sandflies. *L. longipalpis* was extremely abundant in the peridomiciles (99.3%) whereas few specimens were collected in green areas (0.7%) in Divinópolis municipality. *L. sallesi* is commonly recorded in the Minas Gerais State. This species has been found naturally infected by *L. infantum* (Saraiva et al., 2009), although Mayrink et al. (1979) had previously observed specimens of this species infected with trypanosomatids in eastern region of Minas Gerais state (Martins et al., 1978). In this work 30 specimens of *L. sallesi* were collected, representing 2.8% of the sand flies.

L. cortezii has been collected in low numbers (14 specimens) and only in urban areas, however, it is necessary to point out its occurrence, since Carvalho et al. (2008) have found that species infected by *Leishmania (L.) infantum* in the metropolitan region of Belo Horizonte city. Furthermore, in Belo Horizonte city one female of the *cortezii* complex was found infected by *L. braziliensis* (Saraiva et al., 2010). Although the authors cannot incriminate these species as a vector in the transmission of *Leishmania*, they do not reject the possibility of this species to be involved in the cycles of CL and VL. Recently, this species were found infected with *L. infantum* in Mato Grosso do Sul state, Brazil (Andrade et al., 2011)

L. lenti represented 8.3% of the collected sand flies, second most abundant species. This finding deserves to be highlighted in view of the fact that this species eagerly bites humans, horses and dogs. Moreover, *L. lenti* has been found naturally infected by promastigotes in Jacobina city, Bahia state (Sherlock, 1996). Recently, in Divinópolis municipality, natural infection of *L. lenti* by *L. braziliensis* it been reported in a study using molecular biology techniques (Margonari et al., 2010). It is valuable to mention that the last study was conducted in the Gafanhoto Park, one of the green areas that have taken part of the present study. Therefore, the possible epidemiological role of *L. lenti* needs to be clarified.

L. aragaoi accounted for 2.2% of the sand flies. The highest abundance occurred in green areas and a few specimens in peridomestic area. This species has already been found naturally infected by *Leishmania* sp. Margonari et al. (2010) in a study carried out in a green area (Gafanhoto Park) in Divinópolis municipality.

L. whitmani has a wide geographic distribution and high level of adaptation to various ecological niches with populations

displaying different behavioral patterns. This species inhabits primary forest areas in the Amazon region, regions of remaining forests and peridomiciliary areas in northeastern and southeastern Brazil (Rangel et al., 1996). Several authors have shown high abundance of *L. whitmani* in the peridomicile, especially in southeastern Brazil (Brazil et al., 2006). This species is considered one of the main vectors of the etiological agent of cutaneous leishmaniasis in many regions of Brazil (Queiroz et al., 1994; Teodoro et al., 1991).

Ryan et al. (1990) have isolated and characterized specimens of *L. whitmani* naturally infected by *L. braziliensis*. Carvalho et al. (2008) have found *L. whitmani* naturally infected by *L. (Viannia) spp.* using molecular techniques. Saraiva et al. (2010) and Margonari et al. (2010) have reported the infection of *L. whitmani* by *L. infantum* also employing molecular methods.

Twenty specimens of *L. whitmani* were captured in the peridomestic area in Divinópolis municipality. This fact might indicate a tendency to urbanization of this species. According to some authors, this species shows a pattern of peridomestic colonization already acknowledged (Leonardo and Rebêlo, 2004). Nevertheless, recent researches suggest the urbanization of *L. whitmani* (Souza et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Teodoro et al., 2003; Saraiva et al., 2011).

L. intermedia represented 0.4% of the total of collected specimens. This species was collected exclusively in green areas. Occurrence of *L. intermedia* merits to be discussed due to its epidemiological importance, especially in the Southeast of Brazil (Andrade Filho et al., 2007; Marcondes et al., 1997). Lutz and Neiva (1912) have registered a high frequency of *L. intermedia* in residences in the description of the species. This species has been found naturally infected by *L. braziliensis* (Rangel et al., 1996) and it is incriminated to transmit *L. braziliensis* in several localities of Brazil (Andrade Filho et al., 2003; 2007; Gontijo et al., 2002; 2005).

L. neivai accounted for 0.8% of the total of sand flies. Only a single specimen was collected in the urban area in the present study. This species is related to *L. (Viannia) braziliensis* transmission in Brazil (Queiroz et al., 1991; Luz et al., 2000; Andrade Filho et al., 2007). Saraiva et al. (2009) reported the natural infection of *L. neivai* by *L. infantum* in the northern of Minas Gerais state, whereas Margonari et al. (2010), reported this species naturally infected by *Leishmania* sp. in a green area (Gafanhoto Park) in Divinópolis municipality.

One specimen of *L. migonei* and one of *L. pessoai* were collected in this study. Despite the low abundance, it is important to report that the former was incriminated as the vector of *L. braziliensis* and occurs frequently in foci of CL (Queiroz et al., 1994; Pita-Pereira et al., 2005; Rangel and Lainson, 2003; Saraiva et al., 2006). The latter species is anthropophilic and presents high density in endemic regions for CL and has been found naturally infected by promastigote forms considered as *Leishmania* (Pessôa and Coutinho, 1940).

Forattini (1960) studied the seasonal variation of sand flies and verified that in warm and humid months (From December to February), the number of captured specimens was higher, while in colder and drier months (From June to August), the population density became considerably reduced. The same seasonal profile was reported by Barata et al. (2004) in the municipality of Porteirinha, Minas Gerais state, an endemic area for CL.

The pattern of seasonal occurrence of phlebotomine species in the study area was basically determined by the numbers of *L. longipalpis* captured. Collection peaks were observed after periods of intense rainfall and the abundance of sand flies have increased during the following months (from January to May), with a trend to decrease during the colder and drier months. The low number of specimens collected in December might be explained by the fact that immature stages of the sand flies does not develop in drenched places (Lainson, 1982).

Souza et al. (2004) have observed that *L. longipalpis* and *L. whitmani* undergo notable increases in the populations after rainy periods (March and April) in an endemic area for cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais. This fact can be explained by favorable environmental conditions of the microhabitats.

Sherlock (1996) reported a higher occurrence of *L. longipalpis* in both the warmest and the coldest rainy months. These authors have established a correlation among the seasonal occurrence of *L. longipalpis*, human cases of VL and the peridomestic frequency of opossums which demonstrates the importance of knowing the seasonal profile of vector species in each locality.

It is worth paying attention to high percentage of specimens of *L. longipalpis* (84.6%) collected in the locality NLU4. The collection place was a hen house which was used to hang up the trap. Although domestic hens does not have ability to be infected by *Leishmania* and do not act as reservoirs of this parasite. These animals represent an important bond in the epidemiological chain of the VL since they constitute a source of supply to females of *L. longipalpis* (Alexander et al., 2002).

Environmental surveillance based on arthropod vectors provides bases for appropriate interventions in controlling diseases. Indicators delineated by vectors surveillance need to consider the diversity of enzootic activity, the abundance of the species and their rates of natural infection (Gomes, 2002). Regarding to these aspects, the important presence of *L. longipalpis* and species vectors of *L. braziliensis* point out to the necessity to elaborate an intensive entomological surveillance for prevention and control of visceral and cutaneous leishmaniasis in the municipality of Divinópolis.

Acknowledgements

The authors are grateful to the community of the Divinópolis for their collaboration in the field sampling process. The authors are indebted to CAPES, FAPEMIG and CNPq for scholarships. Technical support from LALEI/CRNIF/FIOCRUZ and UFSJ/CCO are gratefully acknowledged.

References

- Alexander, B., Carvalho, R.L., McCallum, H., Pereira, M.H., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Diseases* 8, 1480–1485.
- Andrade, A.R.O., Dorval, M.E.M.C., Andrade, S.M.O., Marques, A., Júnior, M.S.C.L., Silva, B.A.K., Andreotti, R., 2011. First report of natural infection of phlebotomines for Leishmania (*Leishmania*) chagasi captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific J. Trop. Disease* 1, 253–258.
- Andrade Filho, J.D., Galati, E.A.B., Falcão, A.L., 2003. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 1059–1065.
- Andrade Filho, J.D., Oliveira, R.C., Fonseca, A.R., 2008. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malaíse no Centro-Oeste de Minas Gerais. *Neotrop. Entomol.* 37 (1), 104–106.
- Andrade Filho, J.D., Galati, E.A.B., Falcão, A.L., 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 481–487.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- Barata, R.A., Franca-Silva, J.C., Costa, R.T., Fortes-Dias, C.L., Silva, J.C., Vieira, E.P., Prata, A., Michalsky, E.M., Dias, E.S., 2004. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (5), 481–487.
- Barata, R.A., Franca-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., 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 421–425.
- Brasil, 2006. Ministério da Saúde Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
- Brasil, 2007. Ministério da Saúde Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Editora MS, Brasília.
- Brazil, P.P., Brazil, B.G., 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. FioCruz, Rio de Janeiro, pp. 257–274.
- Brazil, R.P., Passos, W.L., Fuzari, A., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. The peridomestic sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J. Vector Ecol.* 31, 418–420.
- Carvalho, G.M.L., Brazil, R.P., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2009. Distribuição geográfica do complexo cortezii (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil. *Neotrop. Entomol.* 38, 876–879.
- Carvalho, G.M.L., Gontijo, C.M.F., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2010. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47 (6), 972–976.
- Carvalho, M.L., Andrade Filho, J.D., Falcão, A.L., Rocha Lima, A.C.V.M., Gontijo, C.M.F., 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* sand flies in a leishmania-endemic area of Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Disorder* 8, 407–414.
- Carvalho, G.M.L., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series davisii and panamensis of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 129–136.
- Costa, S.M., Cechinel, M., Bandeira, V., Zanuncio, J.C., Lainson, R., Rangel, E.F., 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil—mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 149–153.
- DEDCH – Department of Epidemiology, Divinópolis City Hall, 2012. Leishmaniasis records. DEDCH, Divinópolis, Brazil.
- Felipe, I.M., Aquino, D.M., Kuppinger, O., Santos, M.D., Rangel, M.E., Barbosa, D.S., Baral, A., Werneck, G.L., Caldas, A.J., 2011. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (2), 207–211.
- Forattini, O.P., 1960. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). *Arq Hig Saude Publica* 25, 209–221.
- Gomes, A.C., 2002. *Vigilância Entomológica* 11 (2), 79–90.
- Gontijo, C.M.F., Silva, E.S., Fuccio, M.B., Souza, M.C.A., Pacheco, R.S., Dias, E.S., Andrade Filho, J.D., Brazil, R.P., Melo, M.N., 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 81, 43–50.
- Gontijo, C.M.F., Silva, E.S., Pacheco, R.S., Dias, E.S., Oliveira, F.S., Michalsky, E.M., Margonari, C.S., Melo, M.N., 2005. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Araçuaí, Minas Gerais state, Brazil. *Rev. Soc. Iberoam. Inform. Cient* (SIIC).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Cidades@ IBGE.
- Lainson, R., 1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Service, M.W. (Ed.), *Demography of Vector-borne Diseases*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 85–106.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 811L 827.
- Lainson, R., 1982. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 569–596.
- Leonardo, F.S., Rebêlo, J.M.M., 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37, 282–284.
- Lutz, A., Neiva, A., 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 4, 84–95.
- Luz, E., Membrive, N., Castro, E.A., Dereure, J., Pratlong, E., Dedety, A., Pandey, A., 2000. Soccot *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. *Ann Trop Med. Parasitol.* 94, 623–631.
- Marcondes, C.B., Day, J.R., Ready, P.D., 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their role as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 (6), 125–126.
- Margonari, C., Soares, R.P., Andrade Filho, J.D., Xavier, D.C., Saraiva, L., Fonseca, A.L., Silva, R.A., Oliveira, M.E., Borges, E.C., Sanguinette, C.C., Melo, M.N., 2010. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47 (6), 1212–1219.
- Martins, A.V., Williams, P., Falcão, A.L., 1978. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Editora da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 195 pp.
- Mayrink, W., Williams, P., Coelho, M.V., Dias, M., Martins, A.V., Magalhães, P.A., Costa, C.A., Falcão, A.R., Melo, M.N., Falcão, A.L., 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73, 123–137.
- Oliveira, E.F., Silva, E.A., Fernandes, C.E., Paranhos Filho, A.C., Gamarra, R.M., Ribeiro, A.A., Brazil, R.P., Oliveira, A.G., 2012. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (3), 396–401.
- Orsini, O., 1940. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brasil Médico* 54, 762–765.
- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., de Figueiredo Barbosa, A., Britto, C.C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905–913.
- PBH, 2011. Prefeitura de Belo Horizonte – Secretaria Municipal de Saúde-Leishmaniose Visceral—Available in <PBH—Prefeitura Municipal de Saúde—Secretarias—Saúde—Leishmaniose Visceral 2011. Accessed in January 12, 2011.

- Available in http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=sau&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&
- Pessôa, S.B., Coutinho, J.O., 1940. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene* 10, 139–142.
- Pugedo, H., Barata, R.A., França-Silva, J.C., Silva, J.C., Dias, E.S., 2005. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 70–72.
- Queiroz, R.G., Vasconcelos, I.A.B., Vasconcelos, A.W., Pessoa, F.A.C., Souza, R.N., David, J.R., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 693–698.
- Queiroz, R.G., Vasconcelos, A.W., Vasconcelos, I.A.B., Sousa, R.N., Pessoa, F.A.C., Alencar, J.E., David, J.R., 1991. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an american cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Parassitologia* 33 (Suppl. 1), 159–167.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 291–310.
- Rangel, E.F., Lainson, R., Souza, A.A., Ready, P.D., Azevedo, A.C.R., 1996. Geographical variation in populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 43–50.
- Resende, M.C., Camargo, M.C., Vieira, J.R., Nobi, R.C., Porto, M.N., Oliveira, C.D., Pessanha, J.E., Cunha, M. da C., Brandão, S.T., 2006. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, state of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 51–55.
- Ryan, L., Vexenat, A., Marsden, P.D., Lainson, R., Shaw, J.J., 1990. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 786.
- Saraiva, L., Andrade Filho, J.D., Falcão, A.L., Carvalho, D.A.A., Souza, C.M., Freitas, C.R., Lopes, C.R.G., Moreno, E.C., Melo, M.N., 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Tropica* 117, 137–145.
- Saraiva, L., Carvalho, G.M., Gontijo, C.M., Quaresma, P.F., Lima, A.C., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2009. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *J. Med. Entomol.* 46, 1159–1163.
- Saraiva, L., Andrade Filho, J.D., Silva, S.O., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2010. 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*, Rio de Janeiro 105 (8), 1033–1039.
- Saraiva, L., Lopes, J.S., Oliveira, G.B.M., Batista, F.A., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 56L 63.
- SEPLAN/PMD, 1998. Secretaria municipal de planejamento. Prefeitura de Divinópolis. Available from: http://licht.io.inf.br/mg_mapas/mapa/cgi/figa.comeco1024.htm
- Shaw, J., Rosa, A.T., Souza, A., Cruz, A.C., 2003. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 337–351.
- Sherlock, I.A., 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 671–683.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., Pacheco, R.S., Fiuza, V.O.P., Brazil, R.P., 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (3), 285–291.
- Silva-Nunes, M., Cavasini, C.E., Silva, N.S., Galati, E.A.B., 2008. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis and description of phlebotomine sand flies populations in the city of Acrelandia, Acre, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 11, 241–251.
- Soares, M.R., Mendonça, I.L., Bonfim, J.M., Rodrigues, J.A., Werneck, G.L., Costa, C.H., 2011. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica* 117 (1), 6–9.
- Souza, C.M., Pessanha, J.E., Barata, R.A., Monteiro, E.M., Costa, D.C., Dias, E.S., 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 795–803.
- Souza, N.A., Andrade, C.C.A., Peixoto, A.A., Rangel, E.F., 2005. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of american cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Med. Entomol.* 42, 986–992.
- Teodoro, U.D., Kühl, J.B., Santos, E.S., Santos, D.R., Santos, A.R., Oliveira, O., Silveira, T.G.V., Lonardoní, M.V.C., 2003. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodidae) em área urbana no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública/Journal of Public Health* 37 (5), 651–656.
- Teodoro, U., Salvia Filho, L., Lima, E.M., Misuta, N.M., Silveira, T.G.V., Ferreira, M.E.M.C., 1991. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no norte do Paraná, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 25 (2), 129–133.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54, 1–881.
- WHO- World Health Organization, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 184 p.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar JE & Dietze R. Leishmaniose visceral (calazar). In: Veronesi R, organizador. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan 1991; p. 706-17.

Alencar RB. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. Acta Amaz 2007; 37(2): 287-292.

Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Portes F, Miranda AM, et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Bras Entomol 2010; 54(2): 304–310.

Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 387-395.

Alexander B, Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg. Infect. Dis 2002; 8, 1480–1485.

Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, et al. Canine leishmaniasis, clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. An Trop Med Parasitol 1994; 88: 371-378.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. Adv Parasitol 2004; 57: 1-88.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its incidence. Plos One 2012; 7(5).

Alves WA & Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro 2004; 20(1): 259-265.

Andrade Filho JD, Lima MLN, Falcão AL, Brazil RP. Sazonalidade dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Entomol 1998; 42: 93-95.

Andrade Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34(4): 323-329.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98: 1059-1065.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão A L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102, 481–487.

Andrade Filho JD, Oliveira RC, Fonseca AR. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malaise no Centro-Oeste de Minas Gerais. Neotropical Entomology 2008; 37(1):104-106.

Andrade ARO, Dorval MEMC, Andrade SMO, Marques A, Júnior MSCL, Silva BAK, et al. First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania (Leishmania) chagasi* captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2011; 1: 253-258.

Aragão HB. Leishmaniose tegumentar e a sua transmissão pelo Phlebotomus. Mem Inst Oswaldo Cruz 1922; 82: 143.

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

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75 (4): 537-5.

Ashford RW & Bettini S. Ecology and epidemiology: Old World. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Peters W, Killick-Kendrick R (Eds). Academic Press, London, UK 1987; 365–424.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin. Dermat* 1996; 14:523-532.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *J. Trop. Med. Hyg* 1998; 59: 53-57.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol* 2000; 30: 1269- 81.

Azevedo ACR, Luz SLB, Vilela ML, Rangel EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 509-512.

Azevedo ACR, Souza NA, Meneses CRV, Costa WA, Lima JB, Rangel EF. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the north of state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(4): 459-464.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 2008; Vol. 24, Nº. 7.

Barata RA, Franca-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Vieira EP, et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004; v. 99, n. 5, p. 481-487.

Barata RA, Franca-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2005; 38: 421-425.

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

- Barretto MP. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (*Ditera: Psychodidae*), Tese de Livre-Docência, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo 1943; 162 pp.
- Basano AS & Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar Americana: histórico epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol 2004; vol. 7, N°3.
- Bates PA & Rogers ME. New insights into developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med 2004; 4(6): 601-9.
- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol 2007; 37(10): 1097-106.
- Bettini S & Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area its implications for human leishmaniasis. Ins Sci appl 1986; 7: 241-245.
- Black WC & Moore CG. Population biology as a tool to study Vector borne diseases. Biology of Disease Vectors 2005; 2ed pp. 187–206.
- Borja-Cabrera GP, Pontes NNC, da Silva VO, de Souza EP, Santos WR, Gomes ER, et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilAsaponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). Vaccine 2002; 20: 3277-84.
- Brandão-Filho SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97: 291–6.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral 1º. ed. Brasília: MS 2006; 122p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2º. ed. Brasília: MS 2007; 182 p.
- Brazil PP & Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel, E. F., Lainson, R. (Eds.), Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; pp. 257–274.

Brazil RP, Passos WL, Fuzari A, Falcão AL, Andrade Filho JD. The peridomiciliar sand fly fauna (Diptera:Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Vector Ecology* 2006; v. 31, p. 418-420.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AV, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Trop S Paulo* 2003; 45: 79-83.

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(5): 1263-1267.

Camargo LMA & Barcinski MA. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar *Ciência e Cultura* 2003; 1:34-7.

Carvalho MR. Ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ 2005.

Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Tropica* 2006; 98: 277-285.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima AC, Contijo CM. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 407-414.

Carvalho GML, Brazil RP, Falcão AL, Andrade Filho JD. Distribuição geográfica do complexo *cortelezzii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil. *Neotrop. Entomol* 2009; 38, 876–879.

Carvalho GML, Gontijo CMF, Falcão AL, Andrade Filho JD. Study of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Collected in a *Leishmania*-Endemic Area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Brazil. *J. Med. Entomol* 2010; 47(6): 972-976.

Carvalho GML, Brazil RP, Sanguinette CC, Andrade Filho JD. Description of *Evandromyia spelunca*, a new phlebotomine species of the *cortelezzii* complex, from

a cave in Minas Gerais State, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites & Vectors* 2011; 4:158.

Choi CM & Lerner EA. Leishmaniasis as an Emerging Infection. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc* 2001; 6: 175-182.

Corredor A. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South América. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 195.

Costa FSO. Detecção de DNA de *Leishmania* spp em roedores silvestres e sinantrópicos em área de transmissão das leishmanioses no município de Araçuaí, Minas Gerais, Brasil: uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas implicações epidemiológicas. Tese de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro 2002; 98 pp.

Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 149-153.

CREVISA, Centro de Referência de Vigilância em Saúde Ambiental ,” Leishmanioses. Divinópolis, Brasil 2010.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1994; 50(3): 296–311.

Dantas Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 2007; 139-146.

David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JW. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 839-47.

Deane MP & Deane LM. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposas (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectadas por *Leishmania donovani*. O Hospital 1954; 46: 651-653.

Deane LM & Deane MP. Observações preliminares da importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani*, em área endêmica do calazar, no Ceará. Hospital (Rio J) 1955; 48: 79-98.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro 1956.

Deane LM & Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev.Inst. Med. Tropical 1962; 4:198-212.

De Bruijn MHL & Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica 1992; 52: 45-58.

DEDCH - Department of Epidemiology, Divinópolis City Hall. Leishmaniasis records Divinópolis, Brazil 2012.

De Lima H, De Guglieimo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and Black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara state, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(2): 169-174.

Descoteaux A & Turco JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochim Biophys Acta 1999; 1455: 341-52.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica no estado de Minas Gerais. Rev Inst Med Trop 1977; 19 (6): 403-410.

Dias ES, Silva JCF, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. Ver. Soc. Bras. Medicina Tropical 2007; 40(1): 49-52.

Dias ES. *Psychodidae*. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. Atheneu 2011; 12 ed. 377-85.

Dorval ME, Cristaldo G, Rocha HC, Alves TP, Alves MA, Oshiro ET, et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 695-702.

Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Harith AE, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the Island of Gozo. Parasitol 1992; 105: 35-41.

Elnaiem DEA, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME, Mekkawi AM, et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern sudan. Am. J. Trop. Med. Hyg 2003; 68(1): 10-17.

Evans TG, vasconcelos IAB, Lima JW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 118-123.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD, et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81: 155-163.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JB, Barros GC, Momen H, Grimaldi Júnior 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 1991; 86(4):499-500.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vierira VP, Santos CB, Varejão JBM, et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98:1003-1010.

Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, Freitas E, Melo MN, et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 2008; 26(46): 5888-95.

Ferreira EC. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG). Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ 2010.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1960; 2: 195-200.

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares no estado de São Paulo. *Arq Fac Hig Saude Publica. Univ Sao Paulo* 1973; 7: 157-168.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 131: 213-220.

Galati EAB, Nunes VLB, Oshiro ET, Rego FA Jr. Nova espécie de Phlebotominae, *Lutzomyia corumbaensis*, sp. n. (Diptera, Psychodidae) do complexo *Lutzomyia cortelezzii*. *Rev Bras Entomol* 1989, 33:765-475.

Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, et al. Study of the phlebotomines (Diptera: Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Públ* 1996; 30, 115-128.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; pp. 23–51.

Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, et al. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 10(2): 175-193.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania*

(*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J. Comp. Pathol 2006; 135: 100–107.

Gomes AC. Vigilância Entomológica 2002; v. 11, n. 2, p. 79-90.

Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, De Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil Acta Trop. 2002; 81: 143-150.

Gontijo CMF & Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol 2004; Vol. 7, Nº 3.

Gontijo CMF, Silva ES, Pacheco RS, Dias ES, Oliveira FS, Michalsky EM, et al. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Araçuaí, Minas Gerais state, Brazil. Rev. Soc. Iberoam. Inform. Cient. (SIIC) 2005.

Gordon R & Crewe W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of Chrysops and Cimex. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 1952; 42: 335-356.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol 2003; 33(10): 1027-1034.

Goto H & Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev. Anti Infect. Ther 2010; 8(4). 419-433.

Grimaldi GJr & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev 1993; 6, 230–250.

Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control (Invited review). Int J Parasitol 2005; 35, 1169-1180.

Handman E & Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol 2002; 18:332–334.

Hanson WJ. The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera, Psychodidae). Ann. Ent. Soc. Amer 1961; 54: 317-322.

Hommel M. The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. Bull Inst Pasteur 1978; 75: 5-102.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2011. Cidades@ IBGE.

Kassiri H, Naddaf, SR, Moheballi M, Javadian EA. Molecular characterization of *Leishmania* Infection in Sand flies From Sistan Va Baluchistan Province, Southeastern Iran. Jundishapur J Microbiol 2012; 5(2): 430-433.

Killick-Kendrick R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann. Parasitol. Comp. Hum 1990; 65(Suppl1):37–42.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheaux C, Delure J, Puech MP, Cadiergues MC. Controle da Leishmaniose canina - proteção de cães contra picada de mosquitos do gênero flebótomos com coleiras de deltametrina. Med Vet Entomol 1997; 11: 105-111.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62 (3): 385-395.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso, and observations on two distinct of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Trans R Soc Trop Med Hyg 1970; 64 (5): 654-667.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. Brit Med Bull 1972; 28: 44-48.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75 (4) :530-536.

Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans. R. Soc. Med. Hyg 1982; 77, 569–596.

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

Lainson R & Shaw JJ. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections 9^o ed. London: Edit. Feg Cox 1988.

Lainson R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of American leishmaniasis. In: Service MW, editor. Demography and vector- borne diseases. Boca Raton: CRC Press 1989; p. 85-106.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA, et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85: 135-7.

Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Revista Paraense de Medicina 1997; 11(1): 29-40.

Lainson R & Shaw JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds.), Topley & Wilson's microbiology & microbiol infections, 9th ed., vol. 5, Parasitology, Arnold, London 1998; p. 242-266.

Lainson R & Rangel EF. Ecologia das Leishmanioses. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. 2003.

Lainson R & Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press 2005; p. 313-49.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100: 811-27.

Leonardo FS & Rebêlo JMM. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2004; 37: 282-284.

Loiola CF, Da Silva DA, Galati EA. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 581-5.

Lutz A & Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1912; 4: 82-95.

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong E, Dedety A, et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 2000; 94: 623-631.

Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 551-555.

Madeira MF. Avaliação parasitológica nas leishmanioses caninas. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz 2005.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Gomes MLS, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro 2008; 24(12): 2941-2947.

Marcondes CB, Day JR, Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their role as vectors of *Leishmania braziliensis*. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene 1997; v. 91, n. 6, p. 125-126.

Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31(1): 51-58.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(1): 31-38.

Margonari C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. J. Med. Entomol 2010; 47(6): 1212-1219.

Margonari C, Menezes JA, Rocha MN, Maia KN, Oliveira ME, Fonseca AL, et al. Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. J. of Trop Med 2012.

Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 1956; 8 (4): 577-581.

Martins AV, Williams P, Falcão AL. American Sandflies (Diptera): Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências 1978; 195p.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80: 349-357.

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saúde Pública 1994; 10: 359-375.

Maurício IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16: 118-189.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. Ann Trop Med Parasitol 1979; 73: 123-137.

Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Clinics 2008; 64: 451-6.

Melo LA. Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ 2008.

Migone LE. Un caso de kalazar a Asunción (Paraguay). Bull Soc Path Exot 1913; 6:118-20.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 185-188.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 1994; 88: 491–493.

Momen H, Grimaldi GJr, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1987; 82, 447–448.

Momen H & Cupolillo E. Speculations on the Origin and Evolution of the Genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(4): 583-588.

Monteiro SP, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. Rev. Sociedade Brasileira de Med. Trop 1994; 27: 67-72.

Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Ver Soc Bras Med Trop 2005; 38: 147- 152.

Monteiro CC. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela picada. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG). Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ 2012.

Moreno J & Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology 2002; Vol. 18, Nº. 9.

Moreno E, Melo MN, Antunes CMF, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade Ribeiro AS, et al. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. Informe Epidemiológico do SUS 2002; 11: 37-9.

- Murray HW, Flanders KC, Donaldson DD, Sypek JP, Gotwals PJ, Liu J, et al. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73: 3903-3911.
- Nascimento J C, Paiva B R, Malafronte 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. *Rev Inst Med Trop, Sao Paulo* 2007; 49: 119-122.
- Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 1231-1239.
- Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saúde Pública* 2003; 19: 933-944.
- Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(6): 540-543.
- Orsini O. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brasil Médico* 1940; 54:1-766.
- Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Junior HFA, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* 2007; 23(1): 87-94.
- Paiva Cavalcanti M, Lorena VMB, Gomes YM. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Rev. Patologia tropical* 2008; 37(1): 1-14.
- Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop* 2010; 115: 126-130.

Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, et al. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol. Res* 2008; 103:1273-1278.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban área of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1993; 88: 103 -110.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degrave W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica* 1999; 251-258.

PBH. Prefeitura de Belo Horizonte. Secretaria Municipal de Saúde-Leishmaniose 2012.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Med* 1934; 18: 940-50.

Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. In Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(2): 161-164.

Pessôa SB & Coutinho JO. Infecção natural do *Phlebotomeu pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene* 1940; 10: 139-142.

Pessoa FAC, Medeiros JF, Barrett TV. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 593-599.

Peters NS, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kiling N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321:970-4.

Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitol* 1997; 115: 359-369.

Pinto IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, da Silva GM, Falcão AL, Dietze R, Falqueto A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *J Vector Ecol* 2012; 37(1) :90-6.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, de Figueiredo Barbosa A, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 905-913.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2005; 38: 70-72.

Quaresma PF, Murta SMF, Ferreira EC, Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 2009; 111: 289–294.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, Silva SR, Júnior AJM, Neto RGT, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105: 579– 585.

Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FAC, Souza RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 693-698.

Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev, Soc. Bras. Medicina Tropical* 2012; 45(3): 313-317.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 8: 347-349.

Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Azevedo ACR. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 43-50.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; pp. 291–310.

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

Rebêlo JM, Araújo J, Carvalho M, Oliveira ST, Silva FS. Flebotomos (Diptera, Phlebotominae) da ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(3): 247-53.

Rebêlo JMM. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública 2001; 17 (1): 221-227.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, de Silva FS, Barros VLL, Costa JML. Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. Rev Bras Biol 2001; 61: 107-115.

Reithinger R & Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am. J. Trop. Med. Hyg 1999; 61, 530–541.

Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto NMN, Oliveira CDL, et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39(1):51-55.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. Parasitol. Hum. Comp 1990; 65(3): 111–125.

- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990; 71: 267-275.
- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 9: 2246-2252.
- Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania (V.) braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 47-9.
- Romero GA & Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: 584.
- Ross R. Notes on the bodies recently described by *Leishmania donovani*. *Bras. Med. J* 1903; 11:1261-1262.
- Rotureau B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2006; 74: 87-96.
- Ryan L, Vexenat A, Marsden PD, Lainson R, Shaw JJ. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:786.
- Sacks DL & Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984; 223:1417-1419.
- Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:56-63.
- Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46: 1159-1163.
- Saraiva L, Andrade Filho J D, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and

visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2010; Vol. 105(8): 1033-1039.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. Acta Tropica 2011; 117: 137–145.

Schallig HDFH, Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Vector Borne Zoonotic Dis 2007; 7(3):387-93.

Shannon, RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. Am J Trop Med Hyg 1939; 19: 131-148.

Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83: 486-490.

Shaw JJ. New world leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In Farrel J, editors. World Class Parasites: *Leishmania*. Vol 4. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers 2003; P. 11-31.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2006; 101(5): 577-579.

Shaw JJ. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102: 541-547.

Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J. Med. Entomol 2005; 42(6):928-938.

SEPLAN/PMD. Secretaria municipal de planejamento. Prefeitura de Divinópolis. Disponível em: http://licht.io.inf.br/mg_mapas/mapa/cgi/iga_comeco1024.htm.

- Sharma U & Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 2008; 45: 255-272.
- Sherlock IA & Guitton H. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1969; 21: 541-548.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 511.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Junior G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI. Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. Rev Soc Bras Med Trop 1988; 21: 23-27.
- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91(6): 671-683.
- Sherlock IA. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz 2003; 15-21.
- Shlomai J. The assembly of kinetoplast DNA. Parasitology Today 1994; 10: 341-346.
- Silva OS & Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999; 94: 579-582.
- Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. Vet Rec 2000; 147: 421-2.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiúza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(3): 285-291.
- Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. Trends in Parasitol 2005; 21(12), 550-552.

Silva ES, Vandermeide WF, Schoone G, Gontijo CM, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications* 2006; 30, (6):637-643.

Silva AVM, Cândido CDS, Pereira DP, Brazil RP, Carreira JCA. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 2008; 105: 92-94.

Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010; 174: 150-154.

Soares RPP & Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Academia Brasileira de Ciência* 2003; 75(3): 301-330.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (8): 795-803.

Souza AAA, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN, Silveira FT, Martins AFP, et al. Avaliação da sazonalidade do *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) na área endêmica de leishmaniose visceral no município de Barcarena, Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(1): 87.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Peixoto AA, Ward RD. Isolamento reprodutivo de populações alopátricas e simpátricas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 127.

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, et al. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolívia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(1): 5-6.

Teodoro U, Salvia Filho L, Lima EM, Misuta NM, Silveira TGV, Ferreira MEMC. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no norte do Paraná, Brasil. *Revista de saúde pública* 1991; v. 25, n. 2, p. 129-133.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Kühl JB, et al. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de

edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19: 1801- 1813.

Tesh RB & Modi GB. A simple method for experimental infection of phlebotomine sandflies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 41-46.

Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, et al. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 84: 676-677.

Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colômbia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 293-302.

Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004; 173:6521-5.

Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from na endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011; 178: 22-28.

Vieira JBF & Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 85-92.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha A. PCR RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90, 31-37.

Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 427-432.

Ximenes MFFM, Silva VPM, Queiroz PVS, Rego MM, Cortez AM, Batista LMM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - reflexos do ambiente antrópico. *Neotrop Entomol* 2007; 36: 128-137.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol 1993; 30:179-198.

Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. J EukMicrobiol 1993; 40:196-206.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1995; 32:711-25.

Ward RD. Vector biology and control. In KP Chang & R Bray, Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York & Oxford 1985; 199-212.

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro 2008; 24(12): 2937-2940.

Wheeler RJ, Gluenz E, Gull Keith. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. Molecular Microbiology 2011; 79(3): 647-662.

WHO. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases/Leishmaniasis 2010; 91-96.

Young DC & Duncan NA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Ann Entomol Institut 1994; 54: 1-881.