

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

Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais - Brasil

**por
Lara Saraiva**

**Belo Horizonte
2015**

TESE DDIP-CPqRR

L. SARAIVA

2015

LARA SARAIVA

Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais - Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Dr. José Dilermando Andrade Filho

**Belo Horizonte
2015**

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

S243e Saraiva, Lara.

2015

Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais - Brasil / Lara Saraiva. – Belo Horizonte, 2015.

XVIII, 111 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 100 - 111

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor 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 Visceral/prevenção & controle 2. *Leishmania infantum*/parasitologia 3. Phlebotomus/patogenicidade I. Título. II. . Gontijo Ferreira Célia Maria (Orientação). III. Andrade Filho José Dilermando (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

LARA SARAIVA

Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais - Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Dr. José Dilermando Andrade Filho

Banca examinadora:

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Fabiano Duarte Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dra. Maria Helena Franco Moraes (SMS/PBH) Titular
Prof. Dra. Carina Margonari de Souza (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 04 de setembro de 2015

Dedico este trabalho àquela que me deu a vida, e que nela me fez permanecer, por inúmeras vezes, minha amada mãe:

Maria das Dores

*" Não sois máquinas! Homens é que sois!"
(Charles Chaplin)*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todas as instituições envolvidas na concepção, realização e financiamento deste trabalho:

Centro de Pesquisas René Rachou – CPQRR - FIOCRUZ – MINAS – Suporte logístico e financeiro;

Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq – Suporte financeiro;

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG – Suporte financeiro;

Instituto Estadual de Florestas – IEF - Suporte logístico;

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – PBH – Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte – Gerencia de Controle de Zoonoses do Distrito Sanitário Venda Nova - Suporte logístico;

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG - Suporte logístico;

Ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do CPQRR - a todos os professores e profissionais envolvidos pela oportunidade de formação e aprendizado em várias esferas do conhecimento;

Também agradeço: Aos meus orientadores: Dra. Célia Gontijo e Drº José Dilermando pela oportunidade, orientação, persistência e paciência;

Aos componentes da banca por aceitarem avaliar o manuscrito: Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro, Dr. Fabiano Duarte Carvalho, Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, Dra. Maria Helena Franco Morais e Prof. Dra. Carina Margonari de Souza;

Ao Dr. Nilton, ao Luiz Otávio e ao Aluísio por acreditarem no trabalho desde o início e por todo suporte junto às atividades desenvolvidas no DS Venda Nova;

A todos os funcionários da Gerczo-VN que acreditaram e colaboraram com este trabalho, especialmente: Camila, Luiz, Lili, Carlos, Andréia, Edilene, Ana Carolina, Antônio, Marconi, Milvânia, Bruno, Samuel, Raquel, Raimundo, Flávio, Sardinha, Raimundo, Márcia, Maycon, Rose, Adriana, Agustinho, Josy. Warley;

Ao Rogério, Luiza e todos os funcionários da Casa Fernão Dias – IEF – por todo apoio e suporte às atividades realizadas no PES;

A todos os colaboradores do LALEI-CRNIF, GEL, TFL envolvidos nas atividades de bancada, campo, administrativas, e por toda a convivência e aprendizado: Paula, Bruna, Bruno, Cristiani, Helbert, Ana Paula, Gabriel, Agnes, Jeronimo, Ana Cristina, Gabriela, Priscila, Rafaela, Thais, Gustavo Mayr, Gustavo Paz, Paloma, Carolina, Daniele, Josy, Geiza, Andreza, Erika, Jucelia, Luciana, Tamara, Alanna, Felipe, Rosana;

Ao Drº Reginaldo pelo apoio de sempre, e pelos ensinamentos nas etapas relacionadas aos feromônios;

Ao Dr^o Edelberto pela oportunidade no Congresso de Uberaba 2014 e pela convivência;

Ao Felipe por toda a colaboração nos trabalhos de campo e nas análises espaciais;

Ao Juliano (saudades) por toda ajuda e paciência no sequenciamento;

A Alanna por realizar o projeto de iniciação científica em uma das etapas do projeto e pela realização da parte de morfometria;

Ao casal Patrícia e Igor pela colaboração nas etapas de biologia molecular e análises morfométricas, respectivamente;

Aos novos meus colegas do CRL/PCPP e ambulatório de Leishmanioses por me apoiarem e entenderem neste momento complicado. E por me propiciarem um ambiente de trabalho tão agradável. Especialmente a minha chefe Mariana Pedras, por toda a compreensão e apoio;

À biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação.

As “Luzinhas”: Tina, Érika, Faby branca, Faby preta e Maiara pela amizade, apoio e alegria;

A “ala jovem” que me adotou: Tamara, Thais, Agnes, Gabriela, Raquel, por todo aprendizado, alegria e paciência;

As minhas amigas Ana Flávia e Ceres, por tudo, pelo apoio e suporte, compreensão, por ficarem ao meu lado sempre, amo vocês!

A família da Ceres: Zoraide, Bené, e Geiza por todas as hospedagens, apoio e amizade;

A Camila por toda amizade, companheirismo e suporte;

Ao Rodrigo e a Adriana, pela amizade, compreensão e permanência;

A minha querida Ju, por toda amizade e por nunca desistir de mim;

A todos os amigos da Parasitologia ICB-UFMG e do FDS-Lapinha, Rafa, Thiago, Alexandre, Vania, LuPi, Nay, Michele, Cleber (saudades), Laila, pelos momentos de enorme alegria e apoio;

A minha família nuclear, meus irmãos: Adda e Sólon, meus cunhados Cris e César e meus sobrinhos: Lucas, Júlia e Bernardo. Aos meus pais Marias das

Dores e Hamilton (saudades), não há palavras que descrevam a minha gratidão e o meu amor! Vocês são meu tudo! Meu refúgio e minha fortaleza!

As minhas famílias: todos os tios, primos, avós (saudades) por todos os momentos alegres e pelo apoio, e especialmente ao meu primo Tony, por todo apoio, compreensão e amizade;

A todos os animais de outras espécies com os quais tenho e tive o enorme privilégio de conviver, especialmente ao meu Puppy (saudades), Tupã e Exótica, pelas lições de superação e perseverança;

Agradecimento especial.....bom...durante uma caminhada que para mim não foi fácil...eu me tornei uma pessoa ainda mais difícil, mas a vida me presenteou com pessoas capazes de suportar nos piores momentos.... Agradeço especialmente: a minha mãe, a Ana Cristina, Tina, a Érika; ao Jerônimo, a Ceres, a Ana Flávia e Camila, todos foram muito importantes nesta caminhada, mas vocês foram fundamentais!

Enfim agradeço: A todos de que alguma forma e em algum momento me apoiaram incentivaram, o meu muito obrigada!

A Deus, sem palavras...

Resumo

O município de Belo Horizonte e sua região metropolitana ilustram o mais sério exemplo de expansão da leishmaniose visceral no sudeste do Brasil. O município e o parque Estadual do Sumidouro localizam-se no bioma cerrado, segundo maior bioma terrestre da América do Sul. Os objetivos deste projeto foram: estudar a variação sazonal da fauna flebotomínica no DS Venda Nova (Belo Horizonte) e no PES; descrever os padrões de riqueza e diversidade fauna flebotomínica nas formações vegetais do PES e no DS Venda Nova; determinar a taxa de infecção natural de fêmeas capturadas; estudar a variação morfológica das populações de *Lu. longipalpis* coletadas nos diferentes ambientes; avaliar os impactos das ações de controle realizadas no DS Venda Nova nas taxas de ocorrência sazonal e densidade das populações de flebotomíneos. Foram realizadas coletadas mensais no período de agosto de 2011 a agosto de 2013. Os insetos foram identificados de acordo com Galati 2003. As fêmeas coletadas não ingurgitadas foram submetidas à extração de DNA e reações de PCR e de PCR-RFLP para a averiguação da infecção natural por espécies de *Leishmania*. Para comparação das localidades de estudo foi utilizada análise descritiva e índices ecológicos. Para a comparação morfológica trinta casais (quinze proveniente do DS Venda Nova e quinze do PES) da espécie *Lu. longipalpis* foram medidos, e foram comparados tanto as médias como as variâncias dos caracteres entre os grupos. As ações de controle da LV no DS Venda Nova realizadas no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013 foram analisadas descritivamente e relacionadas à curva sazonal de *Lu. longipalpis*. A riqueza, a diversidade e a equitabilidade da fauna de flebotomíneos foram marcadamente diferentes entre o DS Venda Nova e o PES. Na área urbana foram coletados 2.247 espécimes pertencentes a cinco gêneros e oito espécies, a curva de acumulação de espécies atingiu a saturação na 19^o amostragem. No DS Venda Nova a curva de variação sazonal foi delimitada principalmente por *Lu. longipalpis* e 95,3% dos espécimes pertenciam a esta espécie. *Lu. longipalpis* apresentou taxas de infecção natural de 1,01% para *Leishmania infantum* e 1,77% para *Leishmania braziliensis*. No PES foram coletados 4.675 espécimes pertencentes a cinco gêneros e 25 espécies e a curva de acumulação atingiu a saturação na 16^o amostragem. No PES não houve uma única espécie que apresentasse padrão tão pronunciado de dominância. *Lu. longipalpis* correspondeu a 5,35% dos espécimes. Diversas espécies com envolvimento (suspeito ou comprovado) nos ciclos de LTA foram registradas. Uma fêmea do complexo cortellezzi apresentou detecção positiva para *Le. braziliensis*. A comparação morfométrica e de composição de feromônios indicou grande similaridade entre as duas populações de *Lu. longipalpis* avaliadas. A análise realizada para correlação das ações de controle com a variação sazonal de *Lu. longipalpis* indicam a necessidade de estudos pormenorizados para inferências mais robustas. Os resultados evidenciam a dominância da espécie *Lu. longipalpis* no ambiente urbano, e indicam que as mudanças antrópicas no cerrado podem alterar a composição das populações de flebotomíneos e os ciclos de transmissão de patógenos aos humanos.

Abstract

The municipality of Belo Horizonte and its metropolitan region illustrate the most serious example of the expansion of leishmaniasis in southeast Brazil. The municipality of Belo Horizonte, its metropolitan region, and the Sumidouro State Park, are in the Brazilian Savannah biome (Cerrado). This is the second largest terrestrial biome in South America. The aims of this project were: to study the seasonal variation of sand flies in SD Venda Nova (Belo Horizonte) and in the PES; to describe the richness and diversity patterns of sand flies in the vegetable formations of PES and SD Venda Nova; to determine the natural infection rate of females captured; to study the morphological variation of *Lu. longipalpis* populations from different environments; to evaluate the impacts of LV control actions carried out in DS Venda Nova in seasonal occurrence of sandflies. Sampling was performed every month over three consecutive days using HP light traps from August 2011 to August 2013. The insects were identified according to Galati 2003. The non-engorged females were subjected to DNA extraction and PCR reactions and the PCR-RFLP for the investigation of natural infection with *Leishmania* species. To compare the study sites was used descriptive analysis and ecological indexes. In the morphological comparison thirty couples (fifteen from the DS Venda Nova and fifteen PES) of *Lu. longipalpis* species were measured and the means and variances were compared. The LV control actions in DS Venda Nova conducted in the period from January 2011 to December 2013 were analyzed descriptively and related to seasonal curve *Lu. longipalpis*. Richness, diversity and evenness in the study areas, urban and park protected area, were distinct. In Venda Nova SD 2,427 sand flies specimens belonging to five genera and eight species were collected and the species accumulation curve reached saturation in the 19^o sampling. In Sumidouro State Park a total of 4,675 sand flies specimens belonging to nine genera and 25 species were collected and the species accumulation curve reached the saturation in the 16^o sampling. In Venda Nova SD the species seasonal variation curve is predominantly determined by *Lu. longipalpis*. In Venda Nova 95.3% of the collected specimens belonged to the species *Lu. longipalpis* and this species exhibited a natural infection rate of 1.01% for *Le. infantum* and 1.77% for *Le. braziliensis*. In the Sumidouro State Park a total of 4,675 sand fly specimens of 25 species belonging to nine genera were collected. The seasonal curve is not delineated by a unique species. In the park area, *Lu. longipalpis* accounted for only 5.35% of the collected specimens. The main vector of *Le. infantum*, *Lu. longipalpis*, accounted for only 5.35% of the specimens collected. Proven or suspected vectors of *Le. braziliensis* were recorded, and one female of the *cortellezzii* complex tested positive for *Le. braziliensis* DNA. The results make evident the *Lu. longipalpis* dominance in the urban environment. Our data demonstrate that anthropic modifications in the savannah studied area significantly altered the sandflies populations and the *Leishmania* transmission cycles.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Localização do município de Belo Horizonte, sua divisão administrativa com destaque para DS Venda Nova e sua divisão por áreas de cobertura dos centros de saúde; 36
- FIGURA 2 – Localização da região do Carste no estado de Minas Gerais e da Lagoa do Sumidouro, que está inserida no PE Sumidouro. 37
- FIGURA 3 - Pontos de coleta de flebotomíneos com armadilhas luminosas no DS Venda Nova 38
- FIGURA 4 - Locais de exposição de armadilhas luminosas HP no DS Venda Nova, ambiente peridomicilar..... 39
- FIGURA 5 - Pontos de coleta de flebotomíneos com armadilhas luminosas no PES..... 39
- FIGURA 6 - Locais de exposição de armadilhas luminosas HP no PES, ambiente rupícola e de vegetação semi-decídua. 40
- FIGURA 7 - Mapa de Kernel da densidade de espécie vetoras suspeitas e comprovadas coletadas no DS Venda Nova no período de Agosto de 2011 a Julho de 2013..... 55
- FIGURA 8 - Gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de PCR que tem como alvo a região de ITS-1 de *Leishmania* em amostras de fêmeas coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CN - controle negativo. Amostras positivas: 227, 228, 229, 239, 241, 242, 243, 251, 140. Amostras negativas: 244, 245, 246, 259, 261. Controles positivos – cepas de referência: La: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Li: *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Lb: *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Lg: *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 57
- FIGURA 9 - Gel de agarose 4% corado pelo brometo de etídio, mostrando os perfis de restrição da digestão de fragmentos amplificados na reação de PCR que tem como alvo a região de ITS-1 de *Leishmania* em amostras de fêmeas coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb. Amostras positivas: 227, 228, 229, 239, 241, 242, 243, 251, 140. Controles positivos - cepas referência: La: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Li: *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Lb: *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Lg: *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 57
- FIGURA 10 - Mapa de Kernel da densidade de espécie vetoras suspeitas e comprovadas coletadas no PE Sumidouro no período de Setembro de 2011 a Agosto de 2013..... 63
- FIGURA 11 - Gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR ITS-1 de *Leishmania* em amostra de fêmea coletada no Parque Estadual do Sumidouro. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CN - controle negativo. Amostra positiva: 892. Amostras negativas: 893 a 925. CP - controle positivo : *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). 64

FIGURA 12 - A: Espaço de ordenação da Análise de Componentes Principais (PCA) construída com os caracteres morfológicos das fêmeas. B: Dendrograma de similaridade dos caracteres morfológicos para as 30 fêmeas estudadas - Venda Nova (números destacados em preto) e Sumidouro (números destacados em vermelho). A medida de similaridade utilizada foi a de distâncias euclidianas e o algoritmo de grupos pareados.. 72

FIGURA 13 - A: Espaço de ordenação da Análise de Componentes Principais (PCA) construída com os caracteres morfológicos das 30 machos estudados. B: Dendrograma de similaridade dos caracteres morfológicos para as 30 machos estudados - Venda Nova (números destacados em preto) e Sumidouro (números destacados em vermelho). A medida de similaridade utilizada foi a de distâncias euclidianas e o algoritmo de grupos pareados..... 72

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - Variação sazonal de flebotomíneos e dos parâmetros climáticos precipitação total, umidade relativa do ar e temperatura média no DS Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013. 52
- GRÁFICO 2** - Variação sazonal de flebotomíneos e dos parâmetros climáticos precipitação total, umidade relativa do ar e temperatura média no Parque Estadual do Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013. 62
- GRÁFICO 3** - Variação das taxas de riqueza e curva de saturação de espécies no Distrito Sanitário Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro no período de agosto de 2011 a agosto de 2013. 66
- GRÁFICO 4** - Variação do número total de imóveis borrifados mensalmente, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013, e curva sazonal de *Lutzomyia longipalpis*, no período de agosto de 2011 a julho de 2013, no DS Venda Nova. 76
- GRÁFICO 5** - Variação mensal da positividade canina em inquéritos censitários no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013. 79

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Características ambientais dos locais de coletas de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova, Belo Horizonte no período de Agosto de 2011 a Julho de 2013	41
QUADRO 2 - Caracterização ambiental dos locais de coleta de flebotomíneos no Parque Estadual do Sumidouro	42
QUADRO 3 - Ciclos de amplificação da PCR direcionada a região ITS-1 de Leishmania	44
QUADRO 4 - Ciclos de amplificação da primeira reação da nested-PCR direcionada a região SSU-RNA de Leishmania.....	46
QUADRO 5 - Ciclos de amplificação da segunda reação da nested-PCR direcionada a região SSU-RNA de Leishmania.....	46
QUADRO 6 – Lista de caracteres morfológicos mensurados para os exemplares machos e fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> coletados no DS Venda Nova e no PE do Sumidouro	48
QUADRO 7 - Detecção e identificação de DNA de Leishmania em fêmeas de flebotomíneos coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013	58
QUADRO 8 - Resultados de detecção de DNA de Leishmania em fêmeas de flebotomíneos coletadas no PES no período de Setembro de 2011 a Agosto de 2012	65
QUADRO 9 - Feromônios sexuais identificados de espécimes machos provenientes do Distrito Sanitário Venda Nova e do Parque Estadual do Sumidouro	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Total de flebotomíneos coletados por localidade de estudo e sexo, no distrito sanitário Venda Nova – Belo Horizonte, no período de agosto de 2011 a julho de 2013.....	51
TABELA 2 - Índices de diversidade de Margalef, Equitabilidade J e valores de riqueza e acumulação de espécie por evento amostral no DS Venda Nova de Agosto de 2011 a Julho de 2013.	53
TABELA 3 :Quantitativo de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> coletados por mês e área de abrangência no DS Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013.....	54
TABELA 4 : Dosagem de DNA das amostras positivas na PCR ITS1 provenientes do Distrito Sanitário Venda Nova	56
TABELA 5 - Total de flebotomíneos coletados por sexo e ambiente de estudo, no Parque Estadual do Sumidouro, no período de setembro de 2011 a agosto de 2013.	60
TABELA 6 - Índices de diversidade e equitabilidade por local de coleta no PE Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013.....	61
TABELA 7 : Valores de acumulação de espécies, abundância e riqueza específica de flebotomíneos por coleta realizada no PE Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013	61
TABELA 8 - Amostragem de resultados da dosagem de DNA de amostras provenientes do Parque Estadual do Sumidouro	64
TABELA 9 - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares de fêmeas das populações de <i>Lu. longipalpis</i> estudadas.....	68
TABELA 10 - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares machos das populações de <i>Lu. longipalpis</i> estudadas.....	70
TABELA 11 - Número total de imóveis borrifado por área de abrangência e por tipo de borrifação realizada no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013	75
TABELA 12 - Positividade canina em inquéritos censitários por área de abrangência no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013.....	78
TABELA 13 - Registro do histórico dos cães sororreagentes no DS Venda Nova no período de 2011 a 2013	80

TABELA 14 - Casos humanos de LV e óbitos por LV no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013.....	81
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CPQRR – Centro de Pesquisas René Rachou

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DS – distrito sanitário

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ITS - internal transcribed spacers (espaçador transcrito interno)

KM – quilômetros

LTA – leishmaniose tegumentar americana

LV – leishmaniose visceral

MA – Ministério do Meio Ambiente

PB – pares de base

PBH – Prefeitura de Belo Horizonte

PCR: Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)

PES – Parque Estadual do Sumidouro

PM: Peso Molecular

RNA – Ácido ribonucleico

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)

RPM – Rotações por minuto

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

SSU – RNA - small-subunit ribosomal RNA (subunidade menor do RNA ribosomal)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

U - Unidade

UV – Ultravioleta

μL - microlitro

μM – micromolar

°C – graus célsius

SUMÁRIO

1	Introdução e Justificativa	19
2	Objetivos	34
2.1	Objetivo Geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3.	Metodologia	35
4	Resultados	50
4.1	Estudo da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova.....	50
4.2	Estudo da fauna de flebotomíneos no Parque Estadual do Sumidouro	59
4.3	Comparação da composição da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro	65
4.4	Comparação morfométrica e da composição de feromônios sexuais das populações de Lu. longipalpis do Parque Estadual do Sumidouro e do Distrito Sanitário Venda Nova	66
4.5	Ações de controle da Leishmaniose Visceral no DS no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013	73
5	Discussão.....	82
6	Conclusões.....	99
	Referências	100
	Anexos.....	112

1 Introdução e Justificativa

Leishmanioses – aspectos gerais

As leishmanioses são consideradas agravos negligenciados que afetam populações de países em desenvolvimento e apresentam maiores taxas de incidência em populações pobres. Epidemiologicamente estes agravos apresentam padrões endêmicos, epidêmicos e esporádicos, e um amplo espectro de apresentações clínicas com duas formas principais: a visceral e a tegumentar (Desjeux 2001b; WHO 2010).

Este grupo de agravos está fortemente relacionado à pobreza, sendo as taxas de ocorrência em populações sócio-economicamente desfavorecidas muito altas. Ambientalmente estes agravos estão relacionados a situações de moradias inadequadas, ausência de condições sanitárias e migrações (Alvar et al. 2006). As leishmanioses pertencem ao grupo das doenças consideradas como “as mais negligenciadas doenças”, pois estas são ignoradas pela indústria farmacêutica e pelo setor público (Sensky 2002).

As leishmanioses são as mais complexas e diversas de todas as doenças transmitidas por vetores, em sua ecologia e epidemiologia, englobando cerca de 20 espécies de parasitos, diversas espécies de reservatórios e flebotomíneos vetores. Esses agravos apresentam uma ampla variação topo-geográfica em sua ocorrência, apresentando uma distribuição, geralmente, focal. As leishmanioses ocorrem em mais de 100 países do mundo, de clima subtropical ou tropical, em ciclos antroponóticos e zoonóticos (Ashford 1996; Cattand et al. 2006; Lainson & Shaw 1987).

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 65 países e nas Américas cerca de 90% dos casos humanos são registrados no Brasil, com 50.000 mortes estimadas anualmente em todo mundo (Desjeux 2001a; WHO 2010). A leishmaniose visceral é causada por parasitos do complexo *donovani* (*Leishmania (Leishmania) donovani* – *Leishmania (Leishmania) infantum*) e grande parte dos indivíduos apresentam infecção assintomática. Nos casos dos indivíduos que desenvolvem a doença esta apresenta importante morbidade e elevadas taxas de letalidade. Indivíduos doentes quando não tratados, geralmente, evoluem para o óbito. Atualmente, a infecção por estes parasitos apresenta padrões de urbanização e os fatores de

risco individuais são: má nutrição, depressão do sistema imune, especialmente a coinfeção pelo vírus HIV (Brasil Ministério da Saúde 2006; WHO 2010).

Os ciclos de ocorrência das leishmanioses podem variar consideravelmente quanto à presença de animais vertebrados reservatórios, espécies de flebotomíneos vetores e a espécie de parasito. Estes são classificados como zoonóticos ou antroponóticos dependendo da presença ou não de um hospedeiro reservatório não humano (Harhay et al. 2011).

As leishmânias são protozoários pertencentes à família tripanossomatidae, ordem Kinetoplastida, classe Mastigophora, subfilo Sarcomastigophora e filo Protozoa. São parasitos intracelulares obrigatórios, quando infectando o hospedeiro vertebrado. O parasitismo ocorre nas células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente, macrófagos e neutrófilos (Rosenthal et al. 1996; Harhay et al. 2011).

Os hospedeiros vertebrados variam ao se considerar a espécie de parasito e a localidade de ocorrência do ciclo. Várias ordens da classe Mammalia apresentam espécies que são reconhecidas como reservatórios destes parasitos. Nas Américas as ordens que possuem espécies reconhecidas como reservatórios de *Leishmania* são: Rodentia, Marsupialia, Primata, Edentata, Carnivora e Perissodactyla. Considerando os ciclos zoonóticos a compreensão da ecologia e biologia dos hospedeiros reservatórios participantes é fundamental para a compreensão do ciclo do parasito (Ashford 1996).

As interações parasito-hospedeiro entre as espécies de *Leishmania* e as espécies de hospedeiros são extremamente complexas e há diversos estudos que buscam uma melhor compreensão destas (Beattie & Kaye 2011; Dostálová & Volf 2012; Kamhawi 2006). No entanto, há um padrão de fenômenos que pode ser considerado comum para as diversas espécies de parasitos quando infectando o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. De forma geral: as células dos parasitos podem apresentar, basicamente, duas morfologias diferentes: as formas intracelulares sem flagelo aparente, presentes no hospedeiro vertebrado, amastigotas, e as formas com flagelo aparente, presentes no hospedeiro invertebrado, promastigotas.

Os vetores são insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. São insetos holometábolos e apresentam as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. As larvas destes insetos desenvolvem-se em na matéria orgânica em decomposição e o não encontro de larvas na natureza em número compatível com as populações de adultos é uma das muitas lacunas de conhecimento sobre a biologia destes

insetos. Mais de 800 espécies de flebotomíneos já foram descritas e 98 delas são vetores suspeitos ou confirmados de transmitir *Leishmania* (Maroli et al. 2013; Feliciangeli 2004).

As fêmeas de flebotomíneos possuem como estratégia de repasto a telmatofagia (pool-feeding). Neste processo as fêmeas produzem pequenas lesões na pele do hospedeiro, estas lesões possuem tecido cutâneo dilacerado e sangue do hospedeiro. Este será o conteúdo sugado pelas fêmeas (Lehane 2005). Ao realizar o repasto na pele de um hospedeiro vertebrado infectado, as fêmeas podem ingerir macrófagos infectados com amastigotas. A mudança de pH e temperatura são dois fatores associados à mudança morfológica das células do parasito de amastigota para promastigotas. O desenvolvimento de *leishmania* no hospedeiro invertebrado ocorre sempre na luz do trato digestório dos insetos. Durante o processo, as células dos parasitos assumem diversas morfologias e precisam sobreviver ao processo de digestão do sangue. Após evadir a matriz peritrófica os parasitos irão aderir ao epitélio do trato digestório. O local de desenvolvimento das *leishmanias* varia com o subgênero dos parasitos. O subgênero *Leishmania* apresenta desenvolvimento suprapilário e o *Viannia* peripilário (Beattie & Kaye 2011; Dostálová & Volf 2012; Rogers et al. 2014).

As formas infectantes são as promastigotas metacíclicas que migram para a porção anterior do trato digestório e secretam um gel proteico que dificulta a passagem de fluido durante o repasto. Este processo desencadeado pelo parasito favorece a regurgitação dos mesmos na pele do hospedeiro vertebrado, quando a fêmea infectada realiza novo repasto sanguíneo. A picada induz um infiltrado de macrófagos e neutrófilos. Os parasitos são fagocitados por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. No vacúolo parasitário dos macrófagos os parasitos se diferenciam em amastigotas e se replicam de forma sucessiva. Este processo é a causa básica das lesões cutâneas e viscerais, dependendo do sítio onde o mesmo ocorre (Beattie & Kaye 2011; Dostálová & Volf 2012; Rogers et al. 2014). A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida através da ecologia dos flebotomíneos vetores e dos hospedeiros vertebrados. 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). Estes parâmetros estão diretamente relacionados às características dos habitats que as espécies ocupam e atualmente vários estudos postulam que as alterações antrópicas nos ecossistemas podem afetar a dinâmica de ocorrência de zoonoses (Patz et al. 2000; Daszak et al. 2001). Estudos indicam a

associação entre as densidades populacionais de flebotomíneos e determinados tipos de vegetação, postula-se que estas associações possam ocorrer tanto pela busca de locais para abrigo e oviposição, quanto para alimentação de açúcares vegetais necessários para o desenvolvimento e sobrevivência dos flebotomíneos machos e fêmeas (Cameron et al. 1995).

No Brasil, as leishmanioses são zoonoses de grande importância epidemiológica e apresentam padrão de expansão territorial e um intenso processo de urbanização. A leishmaniose visceral apresenta padrões epidemiológicos esporádico e endêmico, ocorrendo em ciclos rurais, peri-urbanos e urbanos (WHO 2010). O agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 e a principal espécie transmissora do parasito é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912).

Tradicionalmente, considerada uma zoonose de canídeos e roedores, transmitida ao homem em ambientes silvestres e localidades rurais, a doença, atualmente, mostra uma distribuição peri-urbana e urbana em diversas cidades da América Latina. No Brasil, o município de Belo Horizonte apresenta altas taxas de incidência e letalidade por este agravo (Lainson & Rangel 2005; Moreno et al. 2006; Dias et al. 2011; Carvalho et al. 2013; Silva et al. 2001).

A leishmaniose tegumentar americana, no Brasil, apresenta uma gama de agentes etiológicos e flebotomíneos vetores. As formas clínicas, o prognóstico, os padrões epidemiológicos e os ciclos de ocorrência variam com as espécies envolvidas nos ciclos. Apesar de ser um fenômeno multi-causal a espécie de parasito determina fortemente as características clínicas da LTA (WHO 2010).

A leishmaniose visceral possui importante expressão epidemiológica no Brasil, com uma incidência anual estimada de 4.200 a 6.300 casos. A incidência estimada da LTA é muito elevada variando entre 72.800 a 119.600 casos. Os dados brutos de incidência anual são imprecisos, pois há graves problemas de subnotificação no sistema público de informações em saúde no Brasil (Alvar et al. 2012).

Na região sudeste do Brasil, as leishmanioses apresentam expressiva expansão geográfica e aumento significativo no número de casos. A região metropolitana da cidade do Rio Janeiro, com elevada incidência de leishmaniose tegumentar e a introdução recente seguida de rápida expansão territorial e em número de casos da leishmaniose visceral no estado de São Paulo são exemplos da gravidade da situação epidemiológica destes agravos no sudeste brasileiro (Cardim et al. 2013; Barata & Confalonieri 2011).

O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 22% do território brasileiro. Este bioma é considerado um *hotspot* de biodiversidade e, no entanto, sofre uma excepcional perda de habita (Brasil Ministério do Meio Ambiente 2014). Extensas áreas do bioma são degradadas pelos processos de ocupação humana como a urbanização, atividade agropecuária e de produção de carvão. Mais de 50% da área total do cerrado já foi ocupada para atividades produtivas (WWF 2014). Estas modificações antrópicas podem favorecer os ciclos de ocorrência de determinados patógenos através da eliminação dos habitats naturais de reservatórios e vetores e adaptação dos mesmos ao convívio com seres humanos (Gomes & Neves 1998; Correa Antonialli et al. 2007).

Um estudo realizado na região do Parque Estadual do Rio Doce, localizado na região sudoeste do Estado de Minas Gerais registrou as mais elevadas taxas de incidência de casos humanos de leishmanioses nas áreas mais próximas ao parque (Souza et al. 2014). Tanto em regiões endêmicas como em áreas com registros recentes de casos, conhecimentos acerca das populações de flebotomíneos são precondições para a elaboração e implementação de medidas de controle destes agravos. Em áreas silvestres e de potencial turísticos o conhecimento do risco ao quais residentes e turistas estão expostos é essencial para a realização das medidas de vigilância e do manejo de potenciais pacientes. Dados epidemiológicos sobre áreas visitadas podem ser utilizadas na interpretação do diagnóstico especialmente no caso de turistas que retornam de áreas endêmicas (Scarlsbrick et al. 2006).

Flebotomíneos e interações com outros organismos

O principal fator que estimula e embasa os estudos sobre os flebotomíneos é o papel vetorial exercido por algumas espécies deste grupo. No entanto, este grupo de insetos está relacionado à transmissão de diversos agentes etiológicos de agravos com menor notoriedade na literatura científica e na saúde coletiva mundial tais como: *sandfly fever*, meningite do verão, estomatite vesicular, encefalite do vírus Chandipura e doença de Carrión (Alexander & Maroli 2003; Maroli et al. 2013; Young & Duncan 1994).

Além disso, os flebotomíneos estabelecem interações com diversos grupos de microorganismos, como descrito em estudo realizado com espécimes de *Lu. longipalpis* oriundos de Posadas, na Argentina, e da gruta da Lapinha, na região metropolitana de Belo Horizonte. Neste estudo os autores utilizaram a metodologia de *high-throughput* pirosequenciamento para analisar moléculas de RNA extraídas dos flebotomíneos. Sequências

de várias taxa foram encontradas, de plantas, metazoários, fungos bactérias e protozoários (McCarthy et al. 2011). O número de espécies relacionadas à *Lu. longipalpis* variou consideravelmente de acordo com o ambiente estudado (área endêmica com maior modificação antrópica e área não endêmica com perfil silvestre). Estes resultados demonstram a importância de se considerar os aspectos ambientais ao se estudar e buscar interpretar aspectos da biologia dos flebotomíneos.

A possibilidade de interações entre os organismos muitas vezes não é considerada nos estudos. Por exemplo, (McCarthy et al. 2011) no trabalho citado, dado o encontro de sequências de espécies que são parasitos de vegetais, os autores inferem sobre a possibilidade dos flebotomíneos atuarem como vetores de patógenos de plantas durante a alimentação nos vegetais.

Em estudo realizado por (Caligiuri et al. 2014) os autores enfatizam a importância de se estabelecer metodologias que permitam identificar corretamente os organismos que interagem com os flebotomíneos. Os autores desenvolveram um par de iniciadores para uma reação de PCR que amplifica uma região de 207pb que permite a detecção e identificação de organismos do gênero *Gregarina* a partir do DNA total extraído de flebotomíneos. Organismos deste grupo são parasitos naturais dos flebotomíneos e os mesmos representam uma potencial ferramenta para o controle biológico destes insetos.

Ao se considerar as interações destes insetos com os membros da família Trypanosomatidae, o gênero *Leishmania* é o principal de alvo de estudo para detecção e a identificação de espécies e espécimes, dada a grande importância epidemiológica deste grupo de protozoários. A metodologia utilizada antes do advento das técnicas de biologia molecular para detecção e identificação destes parasitos consistia na dissecação das fêmeas de flebotomíneos. E exame do trato digestório ao microscópio óptico com posterior metodologia para isolamento do parasito em meio de cultura, ou inóculo em animais de laboratório. No entanto esta metodologia requer profissionais experientes, e demanda longo tempo de execução (Saraiva et al. 2009; Saraiva et al. 2010; Perez et al. 1994).

Atualmente, diversos alvos podem ser utilizados para a detecção e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos. Regiões do kDNA dos parasitos, a subunidade menor do RNA ribossomal - SSU, a região intergênica 1 - ITS-1 (Freitas-Lidani et al. 2014; Rêgo et al. 2015; Tail et al. 1996; Dweik et al. 2007). Os diferentes alvos apresentam variações de sensibilidade e especificidade, e são necessárias técnicas de PCR-RFLP e reações de sequenciamento para a

identificação dos parasitos. Mas, ao se comparar com a metodologia tradicional são mais sensíveis e específicas, mas não há possibilidade de isolamento dos parasitos para realização de estudos mais aprofundados e muitas vezes a quantidade de DNA recuperada é um fator limitante (Freitas-Lidani et al. 2014; Saraiva et al. 2010).

Leishmanioses no Município de Belo Horizonte e região metropolitana

As leishmanioses são grave problema de saúde pública na região sudeste do Brasil. Belo Horizonte e sua região metropolitana apresentam elevadas taxas de incidência e letalidade devido à leishmaniose visceral. Em 2009 foram registrados 135 casos em Belo Horizonte, dois em Lagoa Santa, seis em Santa Luzia e um em Pedro Leopoldo, municípios pertencentes à Região Metropolitana (SINAN 2014). Belo Horizonte está entre os municípios brasileiros com taxas mais elevadas de incidência e letalidade por LV (Maia-elkhoury & Sena 2008; PBH 2014). Nos anos de 2010 e 2011, foram registrados 227 casos e 34 óbitos, o que gera uma taxa de letalidade foi de 15% (PBH 2014).

Vários estudos indicam a urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte e sua região metropolitana, conseqüentemente, ocorre a urbanização e adaptação dos vetores ao ambiente modificado antropicamente. Especial atenção é dada à espécie *Lutzomyia longipalpis* que apresenta comportamento antropofílico, elevada abundância e alta taxa de infecção natural em Belo Horizonte (Moreno et al. 2006; Souza et al. 2004; Carvalho et al. 2010; Saraiva et al. 2011; Resende et al. 2006).

A espécie *Lu. longipalpis* é a principal vatora de *Leishmania infantum* no Brasil. Desde a década de 1960 vários estudos apontam diferenças morfológicas entre as populações desta espécie, e, mais recentemente, há estudos que afirmam trata-se de um complexo de espécies com variações morfológicas, genéticas e comportamentais (Mangabeira 1969; Lanzaro et al. 1993; Ward 1988). Vários pesquisadores utilizam espécimes de *Lu. longipalpis* coletados na Gruta da Lapinha, localizada na região do Carste de Lagoa Santa para suas pesquisas (Araki et al. 2009; Andrade Filho et al. 1998; Hooper et al. 2006; Rougeron et al. 2010). Apesar do elevado numero de insetos coletados na região, não há estudos mais detalhados sobre os aspectos ecológicos e variação sazonal da fauna flebotomínica na região do Carste e a possível infecção natural dos insetos ainda não foi avaliada.

Assim, a comparação de populações urbanizadas, coletadas em Belo Horizonte, e silvestres, coletadas no Parque Estadual do Sumidouro, onde se localiza a Gruta da Lapinha,

pode fornecer importantes informações sobre os ciclos de ocorrência da LV. Há apenas três estudos sobre a fauna flebotomínica do município de Belo Horizonte (Saraiva et al. 2011; Resende et al. 2006; Souza et al. 2009; Souza et al. 2004) e em nenhum deles buscou-se caracterizar as populações de *Lu. longipalpis* quanto aos aspectos morfológicos e a composição dos feromônios sexuais.

Lutzomyia longipalpis e a urbanização da Leishmaniose Visceral

Vários estudos indicam que um dos fatores que determinou a urbanização da LV foi a adaptação da *Lutzomyia longipalpis* ao ambiente modificado antropicamente (Lainson & Rangel 2005; Souza et al. 2004; Carvalho et al. 2010). Apesar do consenso de *Lu. longipalpis* como um complexo de espécies não há estudos e levantamentos que determinem ou infiram sobre o número de espécies ou sub-espécies existentes e suas características comportamentais (Bauzer et al. 2007). Esta espécie (ou complexo de espécies) é a mais detalhadamente estudada dentre os flebotomíneos (Lainson & Rangel 2005; Soares & Turco 2003). Ainda assim, não existe consenso sobre vários aspectos da biologia deste vetor.

Marcadores moleculares são utilizados para a diferenciação entre as populações de flebotomíneos utilizando uma sequência do gene *per* homólogo ao gene de especiação de *Drosophila* estudou populações simpátrica e alopátricas de *Lu. longipalpis*. As populações alopátricas de Natal, Lapinha e Jacobina foram consideradas geneticamente diferenciadas e com pequeno fluxo gênico entre elas. Populações simpátricas de Sobral também apresentaram diferenciação genética (Bauzer, Souza, et al. 2002; Bottecchia et al. 2004; L. G. Bauzer, Gesto, et al. 2002).

Outro aspecto que diferencia populações de *Lu. longipalpis* são os sons envolvidos na cópula e os feromônios sexuais produzidos pelos espécimes machos (Vigoder et al. 2010). Os feromônios sexuais de *Lu. longipalpis* são moléculas compostas por 16 ou 20 átomos de carbono, com peso molecular que varia de 218 a 272. São compostos voláteis que atraem as fêmeas de maneira coespecífica que são relacionados ao isolamento reprodutivo das populações (Hamilton et al. 2005; Casanova et al. 2006; Dougherty & Hamilton 1997) .

Já foram identificados cinco tipos de feromônios produzidos por diferentes populações de *Lu. longipalpis* no Brasil e os autores sugerem que as populações que produzem diferentes feromônios são reprodutivamente isoladas. A caracterização dos feromônios sexuais é importante uma vez que estes podem representar importante barreira reprodutiva pré-zigótica

para populações de *Lu. longipalpis* (Hamilton et al. 2005; Hamilton et al. 2004; Ward 1988; Souza et al. 2008).

Como citado por Brazil et al. (2009) poucas populações de *Lu. longipalpis* foram caracterizadas quanto a composição dos feromônios sexuais. Em estudo realizado com populações de *Lu. longipalpis* provenientes de Vila Elisa, Assunção, no Paraguai o feromônio sexual foi caracterizada como 9-metil germacreno B. Os autores indicam que esta população é taxonomicamente relacionada com populações brasileiras do estado do Mato Grosso do Sul. Mas os autores sugerem que são necessários outros estudos para avaliar esta similaridade. O mesmo grupo realizou a análise morfométrica dos espécimes e encontrou diferenças entre as populações de Lapinha, Minas Gerais, Santarém, Pará, e Sobral, Ceará (Hamilton et al. 2005).

A adaptabilidade de *Lu. longipalpis* ao ambiente urbano/antropicamente modificado é relatada por diversos autores em várias localidades brasileiras. Geralmente, esta espécie apresenta elevada densidade em áreas urbanas e baixa densidade em áreas silvestres (Oliveira et al. 2003; Pinheiro et al. 2013; Carvalho et al. 2010).

Em estudo realizado por Amora et al 2010, na cidade de Mossoró, importante área endêmica para LV no Rio Grande do Norte, classificadas como área de transmissão intensa pelos critérios dos Ministério da Saúde (Brasil Ministério da Saúde 2006), *Lu. longipalpis* representou 99,86% do total de 2.087 espécimes coletados no período de Janeiro de 2005 a Dezembro de 2006. Apesar da variação sazonal e do maior número de espécimes coletados na estação chuvosa, a espécie foi coletada em todos os meses avaliados. Os autores associam a elevada abundância da espécie no município ao elevado risco epidemiológico para a ocorrência da LV na população.

Fatores ambientais alteram significativamente as características das populações de insetos presentes em determinada localidade. Em estudo realizado na cidade de Sobral, Ceará, as formações vegetais estudadas apresentaram densidades populacionais significativamente diferentes. Neste estudo foram avaliadas as seguintes vegetações: cultivos de milho, feijão, caju, arbustos esparsos e arbustos arbóreos. A densidade de espécimes de *Lu. longipalpis* foi significativamente maior nos cultivos (Cameron et al. 1995). Estes dados demonstram que as modificações antrópicas podem favorecer maiores densidade populacionais de *Lu. longipalpis*. No entanto, a interpretação destes fenômenos é complexa, como demonstrado pelos autores no mesmo estudo a o cultivo de feijão apresentava uma alta abundância de afídeos. E é conhecido que os flebotomíneos sugam os açúcares expelidos por este grupo de

insetos. Mas não há relatos de populações urbanas e silvestres de *Lu. longipalpis*, em áreas próximas, que tenham sido investigadas sob o ponto de vista ecológico e da composição dos feromônios sexuais.

Pesquisas apontam que o sistema de saúde e a medicina podem ter efeito na saúde individual, quando uma pessoa necessita de cuidados específicos, no entanto tem se demonstrado que o efeito dos mesmos na saúde das populações é mínimo ou inexistente. Um dos objetivos principais da saúde pública e da saúde comunitária é a melhoria da saúde populacional, contudo muitas vezes as desigualdades sociais não são consideradas neste processo. É preciso que haja nova concepção de promoção da saúde onde haja foco no empoderamento das populações e na redução das desigualdades sociais (Ridde 2007).

Nas últimas décadas o padrão de ocupação humana dos ambientes principalmente os padrões desorganizados de urbanização tem sido relacionados a emergência e re-emergência de agravos cujos os agentes etiológicos são patógenos transmitidos por vetores artrópodes (Colwell et al. 2011).

Os cães domésticos são considerados os principais reservatórios urbanos de *Le. infantum*, estes animais representam uma importante fonte de contaminação para os vetores (Gontijo & Melo 2004; Giunchetti et al. 2006; Dantas-Torres 2009).

O cão doméstico é uma espécie muito associada ao ser humano, tanto em ambiente rurais como urbanos. Em diversas cidades brasileiras a proporção de cães por número de habitantes é muito elevada. Para o Brasil não há uma estatística oficial mas estudo realizado em municípios do interior o estado de São Paulo apontam estimativas de 1 cão a cada 4 habitantes (Maria Cecilia Goi Porto Alvesa & Margareth Harrison Dominguezc 2005), em Belo Horizonte a estimativa é de 1 um cão a cada 7,5 habitantes (Fiúza et al. 2008).

No ambiente urbano estudos demonstram que o características ambientais e o padrão de cuidado dos tutores com os animais são fatores que influenciam o risco destes animais adquirirem a infecção por *Le. infantum* (Coura-Vital et al. 2014; Coura-Vital et al. 2013; Dantas-Torres et al. 2012), em estudo realizado na regional Noroeste Belo Horizonte demonstra que a condição estrutural das residências podem representar fatores de risco para os cães adquirirem a infecção por *Le. infantum*. Os autores apontam a importância de se considerar outros fatores como a estrutura das residências quando se busca conhecer e interpretar a urbanização da LV.

Apesar dos grandes esforços realizados pelo Ministério da Saúde e pelos órgãos estaduais e municipais de saúde a LV continua a apresentando padrão de expansão geográfica e em número de casos nos municípios brasileiros. A cidade de Belo Horizonte, por exemplo, apesar dos elevados investimentos na execução das estratégias de controle apresenta elevadas taxas de incidência e letalidade da LV e elevada positividade canina (PBH 2014).

As estratégias de controle da LV realizadas pela Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (SMS-PBH) não englobam o monitoramento sistemático das populações de flebotomíneos (PBH 2014). As estratégias adotadas pela SMS-PBH são:

- Controle químico do vetor, com borrifação de cipermetrina/alfacipermetrina no intra e peri-domicílio de regiões com transmissão moderada e intensa;
- Inquérito canino censitário com realização de eutanásia dos cães soro-reagentes para *Leishmania* sp.;

Para ambas as atividades de controle os indicadores que definem as localidades a serem trabalhadas são a incidência de casos humanos e a positividade canina. Estes mesmos parâmetros são usados para avaliar se as medidas de controle são eficazes. Assim, há uma lacuna de informação sobre as populações de vetores tanto para o planejamento, como para a avaliação das estratégias de controle. Não há nenhum indicador entomológico de uso rotineiro para ações de controle e vigilância das leishmanioses que correlacione os aspectos das populações dos vetores ao risco de ocorrência de casos de leishmaniose (PBH 2014; Fiúza et al. 2008).

Os indicadores descritos e preconizados pelo Ministério da Saúde são:

- Índices de setores, localidades positivas;
- Infestação domiciliar;
- Abundância relativa do vetor

Para a Dengue, por exemplo, há o indicador Liraa (Levantamento de índice rápido do *Aedes aegypti*) este indicador permite caracterizar os municípios e relaciona a densidade e dispersão larvária ao risco de epidemias de Dengue (PBH 2014; Brasil 2013). Assim há a necessidade de se formular indicadores ou parâmetros de avaliação dos mesmos que permitam correlacionar a presença de flebotomíneos, a ocorrência de casos humanos e caninos de leishmaniose e que descrevam a situação epidemiológica e suportem inferências sobre as possibilidades de ocorrências de novos casos.

Juntamente com as ações de borrifação e eutanásia de cães soro-regentes o Ministério da Saúde recomenda ações de saneamento ambiental para o controle das leishmanioses. Estas medidas consistem basicamente na limpeza e modificação de quintais e terrenos urbanos, de modo que o ambiente torne-se mesmo propício a proliferação dos flebotomíneos. As principais medidas recomendadas são: eliminação dos resíduos orgânicos e eliminação de fontes de umidade (Brasil Ministério da Saúde 2006).

No município de Belo Horizonte, as ações de borrifação e eutanásia canina são realizadas de forma rotineira, mas o mesmo não ocorre com as ações de manejo ambiental. Elevado número de imóveis são borrifados mensalmente e a grande maioria dos cães soro-regentes são eutanasiados. Segundo dados da SMS-PBH, no ano de 2010, foram realizados 197.232 testes sorológicos caninos, destes 15.409 cães foram soro-regentes (positividade de 7,8%). Dos cães soro-regentes, 11.541 (75%) foram eutanasiados e 66.801 imóveis foram borrifados com alfa-cipermetrina. No ano de 2011, foram realizados 171.937 testes caninos com 9.722 cães positivos (positividade de 5,6 %). Dos cães soro-positivos (83,5%) foram eutanasiados e 66.801 imóveis foram borrifados.

Os diagnósticos caninos são realizados sorologicamente, até julho de 2013 os exames preconizados foram o ELISA, como exame de triagem e a RIFI como exame confirmatório. A partir de julho de 2013 o teste imunocromatográfico DPP passou a ser utilizado como técnica e triagem e o ELISA como confirmatório (Brasil Ministério da Saúde 2006; Faria & Andrade 2012).

Diversos autores questionam as metodologias utilizadas pelo ministério da saúde para o diagnóstico canino. Apesar de (Coura-Vital et al. 2014) demonstrarem que o novo par de exames sorológicos possuem melhor capacidade de detecção da infecção, o mesmos autores apontam que o período para soroconversão pode ser longo e que técnicas moleculares poderiam ser utilizadas para uma detecção mais rápida dos cães infectados (Coura-Vital et al. 2013).

Um estudo realizado no Distrito Sanitário Venda Nova mostrou que apesar do grande número de cães eutanasiados e imóveis borrifados, entre os anos de 2006 e 2010, não houve redução significativa tanto do número de casos humanos como da positividade canina (Saraiva et al. 2012).

Assim, é evidente a necessidade da formulação e implementação de novas estratégias de controle de parâmetros de avaliação das mesmas, para que se mude a realidade epidemiológica da LV no município de Belo Horizonte.

Um dos fatores dificultadores do controle das leishmanioses são as lacunas de conhecimento sobre a biologia dos vetores. Dado o desconhecimento dos locais de criação das larvas destes insetos apenas os insetos adultos são alvo das estratégias de controle. Se a biologia dos insetos fosse melhor conhecida o uso de biolarvicidas e de outras estratégias que visem a eliminação ou redução das larvas poderia ser desenvolvida (McCarthy et al. 2011).

Analisando os ambientes tendo como referência às modificações ambientais induzidas pela espécie humana em algumas regiões do Brasil, os padrões de transmissão das leishmanioses parecem ocorrer em dois ciclos distintos: silvestre e urbano (Lainson & Rangel 2005). A variabilidade nas populações dos parasitos provavelmente está relacionada com os padrões ecológicos das áreas endêmicas, o que inclui as interações entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. Assim, o conhecimento dessas interações entre os organismos e entre estes e o ambiente é fundamental para um melhor entendimento da dispersão da LV em diferentes áreas endêmicas e para a proposição de medidas de controle eficazes.

Justificativa

Conforme classificação da Organização Mundial da Saúde (Cattand et al. 2006) as leishmanioses estão entre as doenças negligenciadas de grande importância epidemiológica, que necessitam de medidas de controle efetivas e que apresentam o potencial de surtos epidêmicos, dada a sua transmissão por insetos vetores. Estudos detalhados da ecologia dos flebotomíneos bem como dos fatores que influenciam a ocorrência dos mesmos em determinadas áreas podem auxiliar na melhoria e eficácia das estratégias de controle das leishmanioses. Como afirmado por (Coutinho 2006) estudos em determinados biomas podem auxiliar a compreensão dos processos ecológicos em outras áreas pertencentes ao mesmo bioma. Assim, um estudo pormenorizado desses insetos em área de cerrado, por exemplo, pode auxiliar na compreensão da epidemiologia das leishmanioses nesse bioma e no controle desta endemia em toda região Sudeste.

Em Belo Horizonte, os primeiros casos humanos de LV ocorreram no ano de 1994, no Distrito Sanitário (DS) Leste. Desde então, a doença atingiu DS's limítrofes como Nordeste,

Norte, Venda Nova e, mais recentemente, Noroeste. No período de 1994 ao início do ano de 2011, foram confirmados 1.401 casos humanos da doença, sendo que estes se concentram nos últimos quatro DS's citados acima. A partir da ocorrência do primeiro caso, a doença apresentou processo de expansão territorial no município, com aumento significativo de casos humanos nos últimos anos. As taxas de letalidade são altas, com 16% em 2010 e a alarmante taxa de 23% no ano de 2009 (PBH 2014).

O DS Venda Nova, escolhido para este estudo, apresenta elevadas taxas de positividade canina e incidência de casos humanos. Em 2011, foram registrados 13 casos humanos, e a taxa de positividade canina foi 6,5 % para exames realizados na amostragem censitária e 17,2% para os exames realizados através da demanda espontânea dos municípios. Este DS localiza-se ao norte de Belo Horizonte, fazendo divisa com os municípios de Vespasino e Ribeirão das Neves. Apresenta características ambientais peculiares, como quintais de grande extensão e população com hábitos rurais. Por estes motivos, a equipe de profissionais do DS elaborou um projeto de Manejo Ambiental para integrar as ações de controle da leishmaniose visceral. Vale ressaltar que Belo Horizonte é o município brasileiro de grande porte que mais sofre com a ocorrência de casos de LV e também o que mais investe em ações de controle. Mas, devido à extrema complexidade epidemiológica as ações de controle realizadas não tem obtido o êxito esperado em reduzir significativamente as taxas de incidência de casos humanos e positividade canina (PBH 2014). Como descrito por Sherlock (1996) a tríade clássica de controle da LV: tratamento dos casos humanos, eutanásia de cães sorologicamente positivos para leishmanioses e uso de inseticida para diminuir as populações de flebotomíneos vetores, pode obter sucesso temporário, mas se ações sobre o vetor não são efetivas, o ciclo da doença tende a seguir seu curso natural.

Além disso, como afirmado por Hamarshah et al. (2009) o estudo das relações entre as variações genéticas e biogeográficas podem levar a um melhor entendimento dos determinantes da distribuição geográfica de patógenos e seus vetores. A detecção da infecção natural em flebotomíneos nos diferentes ambientes e com diferentes graus de modificação antrópica são de extrema importância, pois juntamente com as informações biogeográficas podem ser usadas nas medidas de controle. Estas informações aliadas às análises espaciais podem descrever a situação atual, mas também podem apresentar caráter preditivo, localizando possíveis espécies de vetores e parasitos que podem se tornar epidemiologicamente importantes, bem como novas áreas de risco.

Nesta perspectiva, o estudo das populações de flebotomíneos no Parque Estadual do Sumidouro é de relevância científica. Além, de contribuir para os estudos populacionais de *Lu. longipalpis*, o monitoramento das espécies de flebotomíneos na área do parque pode auxiliar no plano de manejo e em ações de vigilância para as leishmanioses. Considerando os aspectos ecológicos da entomofauna o estudo fornecerá novas informações sobre a biodiversidade local e as relações entre as populações de flebotomíneos e as variantes ambientais presentes na área da reserva.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O estudo é composto de duas vertentes com objetivos gerais distintos:

Estudar aspectos ecológicos de flebotomíneos coletados em área urbana no município de Belo Horizonte (DS de Venda Nova) e área silvestre no Parque Estadual do Sumidouro;

Avaliar a fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) durante a realização de ações de controle da leishmaniose visceral no Distrito Sanitário de Venda Nova, Belo Horizonte.

2.2 Objetivos específicos

Estudar a variação sazonal da fauna flebotomínica e a influência dos fatores climáticos no DS Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro;

Descrever os padrões de riqueza e diversidade de espécies de flebotomíneos nas diferentes formações vegetais do bioma cerrado no Parque Estadual do Sumidouro e nas áreas urbanas do DS Venda Nova;

Determinar a taxa de infecção natural de fêmeas capturadas nos diferentes ambientes;

Estudar a variação morfológica das populações de *Lu. longipalpis* coletadas nas áreas urbana e silvestre;

Avaliar os impactos das ações de controle realizadas no DS Venda Nova nas taxas de ocorrência sazonal e densidade das populações de flebotomíneos;

3. Metodologia

Áreas de estudo

Foram selecionadas duas áreas pertencentes ao bioma cerrado em Minas Gerais que apresentam diferentes níveis de conservação: o Distrito Sanitário Venda Nova, Belo Horizonte e o Parque Estadual do Sumidouro. As características de cada uma das áreas serão descritas a seguir.

Distrito Sanitário Venda Nova (DS Venda Nova) – Belo Horizonte

Fundada em 12 de dezembro de 1897, Belo Horizonte foi a primeira cidade planejada do país e tornou-se capital do Estado de Minas Gerais na recém criada República Federativa do Brasil. Nasceu de uma invenção política, com um traçado urbano para 250 mil habitantes. Hoje com 1,4 % do PIB nacional e 2,3 milhões de habitantes, a cidade é o centro de uma região metropolitana de 4,5 milhões de habitantes. O município localiza-se entre as coordenadas 19 55' Sul e 43 57' Oeste, apresenta clima tropical de altitude, com temperatura média anual em torno de 21°C. A cidade de Belo Horizonte está uma linha de transição entre os dois biomas: cerrado e mata atlântica. No entanto dado o processo de urbanização rápido e desordenado que a região apresenta apenas reduzidos fragmentos podem ser encontrados, a maioria em parques urbanos (Ricardo et al. 2002; IBGE 2015)

Belo Horizonte é dividida em nove Distritos Sanitários (DS) os quais têm definido seu espaço geográfico, populacional e administrativo. O DS Venda Nova é a região mais antiga de Belo Horizonte e completou 300 anos em 2011. A origem e formação datam do ano de 1711, com os tropeiros, que traziam mantimentos e gado do Brasil Central e do Estado da Bahia, para abastecer o então distrito de “Curral D’el Rey”. Caracteristicamente, Venda Nova é o DS de Belo Horizonte que mantém, em maior escala, hábitos e tradição rurais. Casas com terrenos maiores, cultivo de vegetais e criações de animais são frequentes. O DS possui uma área de 28,30 km², e uma densidade demográfica de 8.670,58 habitantes por km². São 64.894

moradias e 89% são casas, portanto uma região horizontalizada, mas com claras perspectivas de verticalização. A altitude varia entre 751 e 1000 metros (PBH 2014) (Figura 1).

O DS Venda Nova é dividido em 16 áreas de abrangência, esta divisão baseia-se na adscrita atendida em cada um dos centros saúde. As áreas de abrangência da regional são: Andradas (VNAN); Céu Azul (VNCA), Copacabana (VNCO), Jardim dos Comerciairos (VNJC), Jardim Europa (VNJE), Jardim Leblon (VNJL), Lagoa (VNLA), Mantiqueira (VNMA), Minas Caixa (VNMC), Nova York (VNNY), Piratininga (VNPI), Rio Branco (VNRB), Santo Antônio (VNSA), Santa Mônica (VNSM), Serra Verde (VNSVCU e VNSVCA) e Venda Nova (VNVN1 e VNVN2).

FIGURA 1 - Localização do município de Belo Horizonte, sua divisão administrativa com destaque para DS Venda Nova e sua divisão por áreas de cobertura dos centros de saúde;



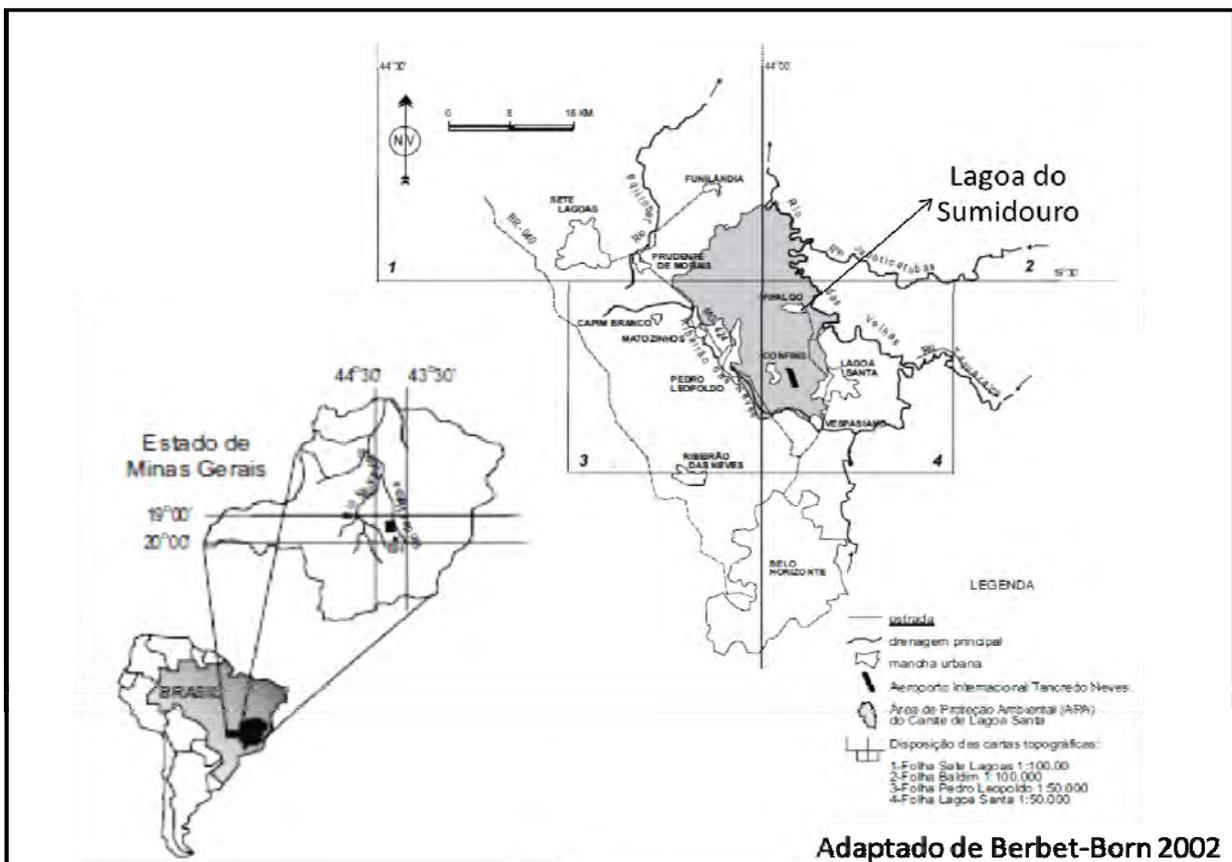
FONTE: adaptado pelo autor de IBGE 2014 e PBH 2014

Parque Estadual do Sumidouro (PE Sumidouro)

A área de ambiente silvestre do bioma cerrado escolhida é o Parque Estadual do Sumidouro que está localizado a 50 km do município de Belo Horizonte. O desenvolvimento do projeto nesta área além de contribuir para os estudos comparativos de populações urbanas e silvestres de *Lu. longipalpis*, será pioneiro em investigar a fauna de flebotomíneos local. A

unidade de conservação foi criada na década de 1980, pelo Decreto 20.375. A vegetação é composta de mata de galeria, cerrado e vegetação rupícola. A flora é formada por espécies como ipê amarelo, ipê roxo, moreira, aroeirinha, jatobá do campo, gabioba, manjoba, mutamba, faveiro dentre outros. A fauna é igualmente rica e nela encontram-se diversas espécies de mamíferos, répteis e aves. Com uma área total de mil e trezentos hectares, o PE Sumidouro está inserido na região do carste Lagoa Santa. Possui relevo formado por rochas carbonáticas e com propensões a processos de dissolução em contato com a água. Essas rochas formaram, ao longo de milhões de anos, as cavernas com seus espeleotemas, as surgências e sumidouros, funcionando como uma esponja que é capaz de absorver e drenar a água para córregos e a lagoa, denominada de Lagoa do Sumidouro. Dentre os atrativos turísticos, destacam-se as 52 cavernas cadastradas e cerca de 170 sítios arqueológicos históricos e pré-históricos (IEF 2013) (Figura 2).

FIGURA 2 – Localização da região do Carste no estado de Minas Gerais e da Lagoa do Sumidouro, que está inserida no PE Sumidouro.



FONTE: Adaptado pelo autor a partir de Berbet-Born 2002

FIGURA 4 - Locais de exposição de armadilhas luminosas HP no DS Venda Nova, ambiente peridomicilar.



FONTE: elaborado pelo autor

No PE Sumidouro 12 armadilhas luminosas foram utilizadas sendo: duas expostas no entorno do parque, duas expostas no interior do parque na área de cerrado, duas na área de vegetação rupícola, duas na área de mata de galeria, duas próximas à entrada da gruta da Lagoa do Sumidouro e duas nas entradas da gruta (Figuras 5 e 6).

FIGURA 5 - Pontos de coleta de flebotomíneos com armadilhas luminosas no PES



FONTE: Elaborado pelo autor a partir de Google Maps

FIGURA 6 - Locais de exposição de armadilhas luminosas HP no PES, ambiente rupícola e de vegetação semi-decídua.



FONTE: elaborado pelo autor

Caracterização ambiental dos locais de coleta

Uma caracterização ambiental simples foi realizada nos pontos de coleta. Neste procedimento foram registradas as características ambientais classicamente relacionadas à presença de flebotômíneos em uma localidade. Os dados climatológicos foram obtidos junto ao Ministério da Agricultura e Abastecimento, Instituto Nacional de Meteorologia.

Na área urbana os locais de coleta foram, na maioria, quintais de residências. Foram registradas cinco características ambientais classicamente relacionadas à ocorrência de flebotômíneos em uma localidade. As características: presença de vegetação e presença de coleção hídrica foram são relacionadas a criadouros e ao ambiente propicio para a permanência dos insetos. As características: presença de animais silvestres e de criação, presença de galinheiro e canil foram relacionadas a fonte alimentar para as fêmeas. Esta descrição está resumida no quadro 1.

QUADRO 1 - Características ambientais dos locais de coletas de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova, Belo Horizonte no período de Agosto de 2011 a Julho de 2013

Área de abrangência	Local de exposição da armadilha	Presença de vegetação	Presença de galinheiro	Presença de canil	Presença de outros animais de criação (suínos, equinos, bovinos)	Presença de córrego, lago ou represa
VNAN	Quintal	Sim	Não	Não	Não	Não
VNCA	Quintal	Sim s	Não	Sim	Não	Não
VNCO	Quintal	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
VNJC	Quintal	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
VNJE	Quintal	Não	Não	Sim	Não	Não
VNJL	Quintal	Sim	Não	Sim	Não	Sim
VNLA	Quintal do Centro de Saúde	Sim	Não	Não	Não	Não
VNMA	Quintal	Sim	Sim	Sim	Não	Não
VNMC	Quintal	Sim	Não	Sim	Não	Não
VNNY	Quintal	Sim	Não	Sim	Não	Sim
VNPI	Quintal do Centro de Saúde	Sim	Não	Não	Não	Não
VNRB	Quintal	Não	Não	Sim	Não	Não
VNSM	Chácara	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
VNSA	Chácara	Sim	Sim	Sim	Não	Não
VNSVCA	Viveiro de plantas	Sim	Não	Não	Não	Sim
VNSVCU	Quintal	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
VNVN1	Quintal	Sim	Sim	Sim	Não	Não
VNVN2	Chácara	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

FONTE: elaborado pelo autor

No PES os locais amostrados foram consistiam em pontos ao longo da principal trilha utilizada para atividades turísticas no parque. A trilha possuía cerca de 1.000 metros de comprimentos, e as armadilhas foram dispostas em uma distância média de 200 metros, apenas 0,08Km² de um total de 13,000 Km² do parque foram amostrados, representando cerca de 6,15% da área total do parque. Ainda assim as áreas estudadas diferiram quanto à composição vegetal e as populações de flebotomíneos. As características ambientais relacionadas foram: o tipo de vegetação, presença de coleções hídricas, presença de rochas, presença de animais domésticos e de fauna local. A descrição sumarizada dos pontos de coleta se encontra no quadro 2.

QUADRO 2 - Caracterização ambiental dos locais de coleta de flebotomíneos no Parque Estadual do Sumidouro

Local de coleta	Tipo de vegetação	Presença de cães e animais de criação	Presença de lago, córrego e represa	Presença de fauna local	Presença de rochas
Entorno do Parque - peridomicílio	Vegetação semi-decídua com elevada modificação antrópica;	Galinheiros e canis (cães domiciliados)	Não	Sim	Não
Cerrado 1	Vegetação semi-decídua;	Cães errantes	Não	Sim	Não
Cerrado 2	Vegetação decídua;	Cães errantes	Não	Sim	No
Área de vegetação rupícola	Vegetação decídua e rupícola;	Cães errantes	Não	Sim	Sim
Entrada da caverna	-	Não	Sim	Sim	Sim
Entorno da caverna	Vegetação decídua e rupícola;	Cães errantes	Não	Sim	Sim

FONTE: elaborado pelo autor

Processamento e acondicionamento dos flebotomíneos coletados

Todos os flebotomíneos coletados foram identificados segundo a classificação proposta por Galati (2003). Os espécimes fêmeos coletados até abril de 2013 foram processados para a realização da detecção de DNA de *Leishmania*. Logo após as coletas as fêmeas foram armazenadas em DMSO 6% e congeladas em freezer a -20 °C. No momento da identificação os três últimos segmentos abdominais e a cabeça das fêmeas foram retirados e montados entre lamina e lamínula em líquido de Berlese. Durante este procedimento era verificada a presença de sangue no intestino dos espécimes. O restante do corpo das fêmeas foi guardado individualmente em tubos de 1,5ml e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

Os demais espécimes foram acondicionados em álcool a 70%, preparados e montados de acordo com as técnicas utilizadas no CRNIF-FIOCRUZ/MINAS para o estudo de fauna. Os espécimes de *Lu. longipalpis* foram utilizados para os estudos morfométricos.

Detecção da infecção natural por *Leishmania*

No momento da extração de DNA uma parte das fêmeas foi processada individualmente e outra parte em grupos de até 20 exemplares, pertencentes à mesma espécie, coletados no mesmo ponto e data de coleta e sem a presença de sangue no intestino.

A extração foi realizada utilizando Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN seguindo o protocolo modificado por (Rêgo et al. 2015). Os espécimes foram macerados em tubos de 1,5ml com o uso de macerador automático de tecidos e pistilos. Posteriormente foram adicionados 100 µl de solução de lise celular para os espécimes individuais e 200 µl para os grupos de espécimes. Em seguida foram adicionados 1 µl de proteinase K (espécimes individuais) ou 1,5µl (para grupos de até 20 fêmeas). Os tubos foram submetidos à homogeneização em vortex e incubados *overnight* em banho seco a 55°C.

Finda a incubação foram adicionados 1µl de solução de RNase (espécimes individuais) ou 1,5µl (para grupos de até 20 fêmeas) e os tubos foram invertidos por cerca de 20 vezes, incubados a 37°C por 30 minutos e depois incubados no gelo por 3 minutos. Após estas duas etapas de incubação foram adicionados 100µl de solução de precipitação de proteínas (espécimes individuais) ou 200 µl (para grupos de até 20 fêmeas), e novamente os tubos foram misturados utilizando o vortex por 20 s em alta velocidade. Para separação das proteínas os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm, 25°C. O sobrenadante vertido em um tubo de 1,5 µl limpo contendo 300 µl de isopropanol. Os tubos foram invertidos 50 vezes e centrifugados novamente por 10 minutos a 14.000 rpm, 25°C.

Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e o tubo seco contra um papel absorvente. Após a secagem dos tubos foram adicionados 300 µl de etanol 70% e 30 µl de acetato de sódio 3M e os tubos foram invertidos cerca de 20 vezes e submetidos a resfriamento de duas horas em freezer a -70°C. Findo o período de resfriamento os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm, 25°C. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos permaneceram posicionados contra um papel absorvente até que todo o álcool secasse. Então foram adicionados 15 µl (espécimes individuais) de solução de hidratação de DNA ou 50 µl para grupos de até 20

fêmeas. Os tubos foram incubados por uma hora a 65°C para hidratar o DNA. Após 24 horas a temperatura ambiente os tubos foram brevemente centrifugados e estocados em freezer a -20°C graus.

Para a avaliação do processo de extração e para se inferir sobre a qualidade do DNA obtido, 20% das amostras foram dosadas no espectrofotômetro NanoDrop – Thermo Scientific e os valores de absorbância a 260 e 280 nanômetros e a razão entre eles considerados. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz foi ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucléicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm foi utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,4 de 1,8. Valores menores que a margem podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes provenientes do processo de extração.

Neste estudo o alvo de primeira escolha para detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras foi o Internal Transcribed Spacer I (ITS I) do rDNA. Esta reação é dirigida ao ITS1 de *Leishmania* (El Tai et al. 2001), e ocorre a amplificação de um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases (Schönian et al. 2003). Os iniciadores utilizados foram: LITSR: 5'CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'. Resumidamente os componentes da reação foram: 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL de cada um dos iniciadores (LITSR e L5.8R) a 10µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 10U/ µL, 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 12,25 µL de H₂O destilada estéril e 5µl da amostra teste, totalizando um volume final de 25µl. As reações foram realizadas em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, seguindo o ciclo abaixo (quadro 3):

QUADRO 3 - Ciclos de amplificação da PCR direcionada a região ITS-1 de *Leishmania*

Ciclos de amplificação		
95°C	2 minutos	desnaturação e ativação enzimática
95°C	30 segundos	desnaturação
53°C	60 segundos	Anelamento
72°C	60 segundos	Extensão
72°C	10 minutos	extensão final
4°C	∞	finalização das reações

 35 repetições

FONTE: elaborado pelo autor

Os resultados foram visualizados utilizando a eletroforese em gel de agarose, 2%, corados pelo brometo de etídio e com padrão de peso molecular de 100pb. Para a exposição dos géis à luz ultravioleta foi utilizado o transluminador L-Pix Ex da Locus Biotecnologia. Como controles positivos das reações foram utilizados DNA extraídos de cultura das cepas de referência, *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), em uma concentração de 20 nanogramas/ μ l.

Para identificação das amostras positivas foi utilizada a reação de digestão enzimática dos produtos amplificados com a enzima Hae III como descrito por Schonian et al., (2003). Resumidamente a reação continha: 1 μ L de HaeIII (10U/mL), 1,5 mL de tampão da enzima, 2,5 mL de H₂O destilada e 10,0 μ L de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e os perfis de restrição analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão dos produtos de PCR de cepas referência (*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Pelos diferentes perfis de restrição apresentados esta técnica proporciona a distinção entre as espécies citadas.

Como técnica auxiliar para detecção e identificação de DNA de *Leishmania* nas amostras de fêmeas de flebotomíneos foram também utilizadas as técnicas de Nested-PCR dirigida ao alvo SSU RNA e o sequenciamento de fragmentos amplificados do SSU RNA da região do ITS-1.

A técnica de nested-PCR dirigida ao alvo SSU RNA de *Leishmania* foi modificada e adaptada por (Cruz et al. 2002). Na primeira reação ocorre a amplificação de um fragmento de aproximadamente 603 pb, com os seguintes iniciadores: R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AATAG 3'. Na segunda reação ocorre a amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, sendo utilizados os iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. Resumidamente as reações foram preparadas da seguinte forma:

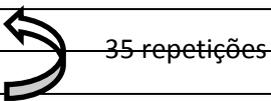
Primeira reação: para um volume final de 50 μ L contendo 10 μ L de DNA da amostra testada, 5 μ L da solução tampão 10x -15mM MgCl₂, 1 μ L de dNTP mix a 10 μ M, 1 μ L de cada iniciador R1 e R2 a 15mM, 1,4 μ L de Taq DNA polimerase a 1U/mL (Biotools) e 30,6 μ L de H₂O destilada estéril. 25 μ L do produto amplificado na primeira reação foram diluídos em 1ml de H₂O para ser utilizado na segunda reação.

Segunda reação: para um volume final de 25 μ L contendo 10 μ L do produto amplificado diluído, 2,5 μ L da solução tampão 10x - 15mM de MgCl₂, 0,5 μ L de dNTP's a 10mM, 0,5 μ L do

iniciador R3 a 15mM, 0,25µL do iniciador R4 a 15mM, 0,7µL de Tth DNA polimerase a 1U/mL (Biotools) e 10,55µL de H₂O destilada estéril. As reações foram realizadas em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, seguindo os ciclos abaixo (quadros 4 e 5):

QUADRO 4 - Ciclos de amplificação da primeira reação da nested-PCR direcionada a região SSU-RNA de *Leishmania*

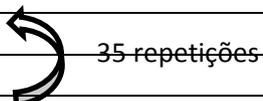
Ciclos de amplificação		
94°C	5 minutos	desnaturação e ativação enzimática
94°C	30 segundos	desnaturação
60°C	60 segundos	anelamento
72°C	30 segundos	Extensão
72°C	10 minutos	extensão final
4°C	∞	finalização das reações



FONTE: elaborado pelo autor

QUADRO 5- Ciclos de amplificação da segunda reação da nested-PCR direcionada a região SSU-RNA de *Leishmania*

Ciclos de amplificação		
94°C	5 minutos	desnaturação e ativação enzimática
94°C	30 segundos	desnaturação
65°C	60 segundos	anelamento
72°C	30 segundos	Extensão
72°C	10 minutos	extensão final
4°C	∞	finalização das reações



FONTE: elaborado pelo autor

Os resultados foram visualizados utilizando a eletroforese em gel de agarose, 2%, corados pelo brometo de etídio e com padrão de peso molecular de 100pb. Para a exposição dos géis à luz ultravioleta foi utilizado o transluminador L-Pix Ex da Locus Biotecnologia. Como controles positivos das reações foram utilizados DNA extraídos de cultura das cepas de referência, *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), em uma concentração de 20 nanogramas/µl.

Os fragmentos resultantes das reações dirigidas à região ITS-1 e do SSU RNA foram sequenciados para realização da identificação das espécies de *Leishmania*. As amostras foram preparadas da seguinte forma: os produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores foram purificados com o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen) segundo

instruções do fabricante. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 1µL dos produtos purificados, 1µL de cada iniciador na concentração de 3,3 pmol, senso ou antissenso, em tubos separados, 1µL de 5x Sequencing Buffer, 1µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e água destilada em quantidade suficiente para o volume final de 10 µL utilizando o programa que alterna 35 ciclos de 95° C por 15 segundos e 65° C por 15 segundos. As sequências foram lidas no sequenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer e analisadas por meio dos softwares Finch TV (Geospiza, Inc.), Sequence Scanner v 1.0 (Applied Biosystems) e MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). O BLAST foi utilizado para o alinhamento das sequências obtidas com as sequências do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Estudo de composição de feromônios e morfométrico e das populações de *Lu. longipalpis*

Os ambientes de estudos foram classificados em dois polos para a comparação populacional: urbano (DS Venda Nova) e silvestre (PE Sumidouro). As populações de *Lu. longipalpis* foram comparadas quanto aos aspectos morfométricos, de composição de feromônios.

Para o estudo da composição dos feromônios sexuais de *Lu. longipalpis* apenas exemplares que chegaram vivos ao laboratório após a coleta foram utilizados, uma vez que para o sucesso do método os insetos devem ser selados ainda vivos em uma pipeta Pasteur de vidro contendo hexano P.A. Os insetos vivos e com características morfológicas indicativas de pertencerem a espécie *Lu. longipalpis* foram entorpecidos pelo frio com a colocação dos potes das armadilhas em freezer e realizada a identificação em lupa.

Posteriormente os insetos foram vedados com o auxílio de um maçarico em pipetas de vidro contendo cerca de 100ml de Hexano. A análise dos feromônios foi realizada em parceria com do Drº Reginaldo Peçanha Brazil e Drº JCG Hamilton e os procedimentos realizados foram os descritos por (Hamilton et al. 2005).

O estudo da variação morfológica foi realizado através da morfometria geral de quinze casais provenientes de cada uma das áreas de estudo. Foram analisadas estruturas da cabeça, tórax e abdômen dos insetos em microscópio óptico (Olympus CH-2), com o auxílio de retículo micrométrico (Kremp Wetzlap, 10x miKrometer)., Um total de 52 caracteres foram analisados para os exemplares machos e um total de 46 para as fêmeas (quadro 6), seguindo-se o modelo padrão de morfometria sugerido pelo CIPA Group, (1991).

QUADRO 6 – Lista de caracteres morfológicos mensurados para os exemplares machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* coletados no DS Venda Nova e no PE do Sumidouro

	Sexo dos exemplares	
	Fêmea	Macho
Comprimento da cabeça	Comprimento da cabeça	Comprimento da cabeça
Largura da cabeça	Largura da cabeça	Largura da cabeça
Comprimento da distância interocular	Comprimento da distância interocular	Comprimento da distância interocular
Comprimento do clipeo	Comprimento do clipeo	Comprimento do clipeo
Largura do clipeo	Largura do clipeo	Largura do clipeo
Comprimento do olho	Comprimento do olho	Comprimento do olho
Largura do olho	Largura do olho	Largura do olho
Comprimento do Labrioepifaringe	Comprimento do Labrioepifaringe	Comprimento do Labrioepifaringe
Comprimento da antena III	Comprimento da antena III	Comprimento da antena III
Comprimento da antena IV	Comprimento da antena IV	Comprimento da antena IV
Comprimento da antena V	Comprimento da antena V	Comprimento da antena V
Comprimento da antena XV	Comprimento da antena XV	Comprimento da antena XV
Comprimento da antena XVI	Comprimento da antena XVI	Comprimento da antena XVI
Comprimento do palpo 1	Comprimento do palpo 1	Comprimento do palpo 1
Comprimento do palpo 2	Comprimento do palpo 2	Comprimento do palpo 2
Comprimento do palpo 3	Comprimento do palpo 3	Comprimento do palpo 3
Comprimento do palpo 4	Comprimento do palpo 4	Comprimento do palpo 4
Comprimento do palpo 5	Comprimento do palpo 5	Comprimento do palpo 5
Comprimento do mesonoto	Comprimento do mesonoto	Comprimento do mesonoto
Comprimento da asa	Comprimento da asa	Comprimento da asa
Largura da asa	Largura da asa	Largura da asa
Comprimento da alfa	Comprimento da alfa	Comprimento da alfa
Comprimento da beta	Comprimento da beta	Comprimento da beta
Comprimento da gama	Comprimento da gama	Comprimento da gama
Comprimento da delta	Comprimento da delta	Comprimento da delta
Comprimento da R5	Comprimento da R5	Comprimento da R5
Comprimento do fêmur anterior	Comprimento do fêmur anterior	Comprimento do fêmur anterior
Comprimento do fêmur mediano	Comprimento do fêmur mediano	Comprimento do fêmur mediano
Comprimento do fêmur posterior	Comprimento do fêmur posterior	Comprimento do fêmur posterior
Comprimento da tíbia anterior	Comprimento da tíbia anterior	Comprimento da tíbia anterior
Comprimento da tíbia mediana	Comprimento da tíbia mediana	Comprimento da tíbia mediana
Comprimento da tíbia posterior	Comprimento da tíbia posterior	Comprimento da tíbia posterior
Comprimento do tarsômero 1 anterior	Comprimento do tarsômero 1 anterior	Comprimento do tarsômero 1 anterior
Comprimento do tarsômero 1 mediano	Comprimento do tarsômero 1 mediano	Comprimento do tarsômero 1 mediano
Comprimento do tarsômero 1 posterior	Comprimento do tarsômero 1 posterior	Comprimento do tarsômero 1 posterior
Comprimento do tarsômero 2 anterior	Comprimento do tarsômero 2 anterior	Comprimento do tarsômero 2 anterior
Comprimento do tarsômero 2 mediano	Comprimento do tarsômero 2 mediano	Comprimento do tarsômero 2 mediano
Comprimento do tarsômero 2 posterior	Comprimento do tarsômero 2 posterior	Comprimento do tarsômero 2 posterior
Comprimento do abdômen	Comprimento do abdômen	Comprimento do abdômen
Comprimento da cerca	Comprimento do coxito	Comprimento do coxito
Comprimento da espermateca	Largura do coxito	Largura do coxito
Largura da espermateca	Comprimento Parâmetro	Comprimento Parâmetro
Comprimento do ducto individual	Largura do Parâmetro	Largura do Parâmetro
Largura do ducto individual	Comprimento Edeago	Comprimento Edeago
Comprimento do ducto comum	Largura Edeago	Largura Edeago
Largura do ducto comum	Comprimento lobo lateral	Comprimento lobo lateral
	Largura lobo lateral	Largura lobo lateral
	Bomba ejaculatória	Bomba ejaculatória
	Pistão	Pistão
	Câmara	Câmara
	Ducto ejaculatório	Ducto ejaculatório
	Comprimento do gonóstilo	Comprimento do gonóstilo

FONTE: elaborado pelo autor

Análise das ações de controle no distrito sanitário Venda Nova

As informações referentes ao número de casos humanos, positividade canina e imóveis borrifados por área de abrangência foram obtidas junto ao banco de dados da Secretaria Municipal de Saúde. Nenhuma informação pessoal como endereço ou nome dos residentes foi acessada. Todos os dados foram organizados por ano e objetivou inferir sobre a qualidade e cobertura das ações realizadas pelo serviço de controle de zoonoses a partir das informações disponíveis nos bancos. Para estas inferências foram consideradas informações que apontam a qualidade e a cobertura do serviço realizado. A análise de padrões de interferência entre as variáveis foi realizada através de testes de correlação não paramétrica dada a natureza da distribuição das variáveis. Parâmetros considerados nas variáveis: fauna flebotomínica, ações de borrição e inquéritos sorológicos caninos:

- Fauna flebotomínica: composição, diversidade e riqueza, abundância e variação sazonal;
- Ações de borrição: cobertura de imóveis borrifados por ano em relação aos totais de imóveis do distrito sanitário e de das áreas de abrangência, e avaliação da borrição peridomiciliar e intradomiciliar;
- Inquéritos sorológicos caninos: cobertura dos inquéritos caninos sorológicos em relação à área geográfica do distrito sanitário e em relação à população canina total. Avaliação da porcentagem de cães eutanasiados;

Análises de Resultados

Todos os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram realizadas no programa Microsoft Excel (Office 2003). As análises estatísticas foram realizadas nos programas Graph Pad Prisma 4.0 e GraphPad InStat e PAST. Para as comparações e correlações serão utilizados testes paramétricos para amostras com distribuição normal e não paramétricos para amostras fora desta distribuição. Os índices ecológicos e a análise de componentes principais foram realizados utilizando o programa PAST. Para as análises de Geoprocessamento foi utilizado o programa ArcGis

4 Resultados

Os resultados serão apresentados em dois blocos seguindo as duas vertentes do estudo: I. Estudo da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário de Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro e II. Análise das ações de controle no Distrito Sanitário de Venda Nova.

4.1 Estudo da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova

A distribuição das armadilhas foi aleatória abrangendo tanto locais com muitas características consideradas favoráveis à ocorrência de flebotomíneos, como locais com poucas características. Por exemplo, a localidade VNSM apresentou diversas características favoráveis, em contraste com a localidade VNLA. É importante ressaltar que todas as localidades apresentaram pelo menos uma característica ambiental relacionada à presença de flebotomíneos. Das 18 localidades, cinco apresentaram apenas uma característica, três apresentaram duas características, cinco apresentaram três características, três apresentaram quatro características e apenas duas localidades apresentaram as cinco características consideradas (quadro 1).

Um total de 2.427 espécimes pertencentes a oito espécies e cinco gêneros foi coletado no distrito sanitário Venda Nova. A razão entre o total de espécimes machos e fêmeas foi de 4,26:1. A espécie que apresentou a maior taxa de abundância foi *Lu. longipalpis*, correspondendo a 95,30% dos espécimes coletados. *Ev. cortelezzii* correspondeu a 1,52% dos espécimes, *Ev. sallesi* a 0,66% e *Nyssomyia whtimani* (Antunes & Coutinho, 1939) a 0,37%. As demais espécies apresentaram valores de abundância relativa muito reduzidos, por exemplo, apenas um exemplar das espécies *Sc. sordellii* e *Pa. lutziana* foi coletado (Tabela 1).

As diferenças das taxas de abundância de espécimes coletados entre as áreas de abrangência ocorreram dadas as diferenças nas abundâncias de espécimes de *Lu. longipalpis*. Apenas a localidade VNSVCA não apresentou nenhum espécime coletado. As demais localidades apresentaram, no mínimo, dois espécimes de espécies diferentes (Tabela 1).

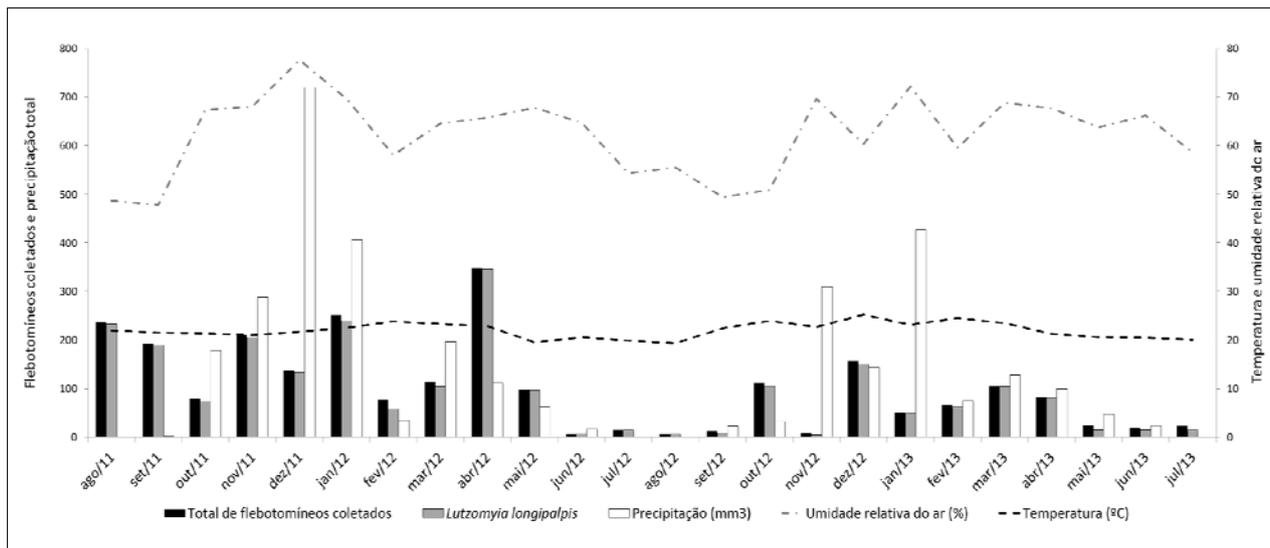
TABELA 1 – Total de flebotomíneos coletados por localidade de estudo e sexo, no distrito sanitário Venda Nova – Belo Horizonte, no período de agosto de 2011 a julho de 2013

Espécies de flebotomíneos	Áreas de abrangência																		Total por sexo		Total		
	VNAN	VNCA	VNCO	VNJC	VNJE	VN JL	VNLA	VNMA	VNMC	VNNY	VNPI	VNRB	VNSM	VNSA	VNSVCA	VNSVCU	VNVN1	VNVN2	♂	♀			
<i>Complexo cortelezzii</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2	6	0	1	4	1	-	19	(0.78)	19 (0.78)	
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	1	1	1	3	5	1	0	3	4	0	1	0	5	5	0	0	4	3	(1.15)	28	9 (0.37)	37 (1.52)	
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	12	2 (0.08)	2 (0.08)	
<i>Evandromyia sallessi</i>	1	0	1	0	2	0	0	0	3	1	0	0	5	0	0	0	3	0	4 (0.16)	15	(0.49)	16 (0.66)	
<i>Evandromyia sp.</i>	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	15	(0.62)	15 (0.62)	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	9	17	45	29	213	5	1	28	111	18	3	11	1229	507	0	9	58	20	(79.07)	1919	(16.23)	2313	
<i>Lutzomyia cavernicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	15	1 (0.04)	1 (0.04)	
<i>Lutzomyia sp.</i>	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	6	1	0	0	1	0	8 (0.33)	15	5 (0.21)	13 (0.54)	
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.04)	15	-	1 (0.04)	
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0	6 (0.25)	15	3 (0.12)	9 (0.37)	
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	15	1 (0.04)	1 (0.04)	
Total	12	18	47	38	238	6	2	32	120	19	6	11	1252	519	0	13	70	24	1966	461	(81.01)	(18.99)	2427

FONTE: elaborado pelo autor

No primeiro ano amostral, os meses de agosto, janeiro e abril apresentaram as mais elevadas taxas de flebotomíneos coletados. Os meses secos e frios apresentaram baixas taxas de coleta. O segundo ano amostral, de forma geral, apresentou taxas de coleta reduzidas e os meses com taxas mais elevadas foram: outubro, dezembro e março (gráfico 1).

GRÁFICO 1 - Variação sazonal de flebotomíneos e dos parâmetros climáticos precipitação total, umidade relativa do ar e temperatura média no DS Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013.



FONTE: elaborado pelo autor

A análise da curva sazonal do flebotomíneos em conjunto com os parâmetros climáticos mostra que os picos de abundância de insetos coincidem com períodos chuvosos e de elevada umidade relativa do ar ou ocorrem logo após estes períodos. Com relação à temperatura média as maiores abundâncias foram observadas nos períodos de temperaturas mais elevadas (gráfico 1). Entretanto, apesar da correlação visual, os parâmetros climáticos não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a curva sazonal de flebotomíneos [Temperatura - (p-valor =0.1052 – Pearson correlation test), Precipitação - (p-valor =0.3798 - Serman correlation test), umidade relativa do ar (p-valor =0.8506 – Pearson correlation test)].

A curva de acumulação de espécies atingiu a saturação na 19ª amostragem, com apenas oito espécies, este dado conjuntamente com o padrão sazonal demonstra claramente a dominância de *Lu. longipalpis* no distrito sanitário Venda Nova (tabela 2). Os índices de diversidade de Margalef e de Equitabilidade J descrevem de forma adequada a situação das espécies de flebotomíneos no DS Venda Nova. A baixa diversidade de espécies e a marcada dominância de *Lu. longipalpis* são bem caracterizadas pelos baixos valores dos índices ao longo do período amostral (tabela 2).

TABELA 2 - Índices de diversidade de Margalef, Equitabilidade J e valores de riqueza e acumulação de espécie por evento amostral no DS Venda Nova de Agosto de 2011 a Julho de 2013.

Coletas	Primeiro ano amostral											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
Riqueza	2	3	3	3	4	4	3	3	2	2	1	1
Acumulação de espécies	2	3	4	5	5	5	5	6	6	6	6	6
Margalef	0.18	0.38	0.46	0.37	0.61	0.55	0.48	0.43	0.17	0.22	0.00	0.00
Equitabilidade_J	0.15	0.08	0.22	0.14	0.12	0.09	0.25	0.13	0.03	0.08	0.00	0.00
Coletas	Segundo ano amostral											
	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°
Riqueza	1	3	2	1	2	1	3	1	1	3	2	3
Acumulação de espécies	6	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8
Margalef	0.00	0.87	0.21	0.00	0.20	0.00	0.48	0.00	0.00	0.63	0.36	0.68
Equitabilidade_J	0.00	0.58	0.30	0.00	0.17	0.00	0.24	0.00	0.00	0.72	0.34	0.64

FONTE: elaborado pelo autor

O padrão de variação sazonal de *Lutzomyia longipalpis* variou consideravelmente entre os anos pesquisados e entre as áreas de abrangência. No primeiro ano amostral (agosto de 2011 a julho de 2012) a espécie apresentou as maiores taxas de abundância (tabela 3). Neste ano a área com maior abundância relativa foi VNSM, com 71,53% dos espécimes coletadas. Este ano a curva total de coleta foi delineada basicamente pelos espécimes provenientes desta área de abrangência e pela área VNJE, com 11,53% dos espécimes. No segundo ano amostral (agosto de 2012 a julho de 2013) a área de abrangência que apresentou maior percentual de espécimes coletados foi VNSA, com 68,84% dos espécimes coletados e VNSM foi responsável por apenas 2,12% dos espécimes (tabela 3).

TABELA 3 :Quantitativo de espécimes de *Lu. longipalpis* coletados por mês e área de abrangência no DS Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013

Ano amostral 1														Total de espécimes coletados	% relativa de espécimes por área de abrangência
Áreas de abrangência	ago/11	set/11	out/11	nov/11	dez/11	jan/12	fev/12	mar/12	abr/12	mai/12	jun/12	jul/12			
VNAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
VNCA	1	0	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	7	0.41	
VNCO	8	17	0	0	0	12	3	0	0	0	1	3	44	2.59	
VNJC	0	0	0	1	3	18	0	0	0	0	0	0	22	1.29	
VNJE	17	39	4	13	12	95	6	10	0	0	0	0	196	11.53	
VN JL	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0.12	
VNLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.06	
VNMA	4	1	1	0	0	4	0	0	1	1	0	1	13	0.76	
VNMC	4	2	1	2	1	30	13	0	6	2	2	0	63	3.71	
VNNY	7	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	11	0.65	
VNPI	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.12	
VNRB	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0.12	
VNSM	191	131	68	186	112	19	3	92	327	84	1	2	1216	71.53	
VNSA	0	0	0	0	1	47	27	1	3	6	0	0	85	5.00	
VNSVCU	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	8	0.47	
VNVN	0	0	0	0	1	7	5	0	5	3	1	6	28	1.65	
Total	233	190	74	205	133	240	58	104	346	97	6	14	1700	100.00	

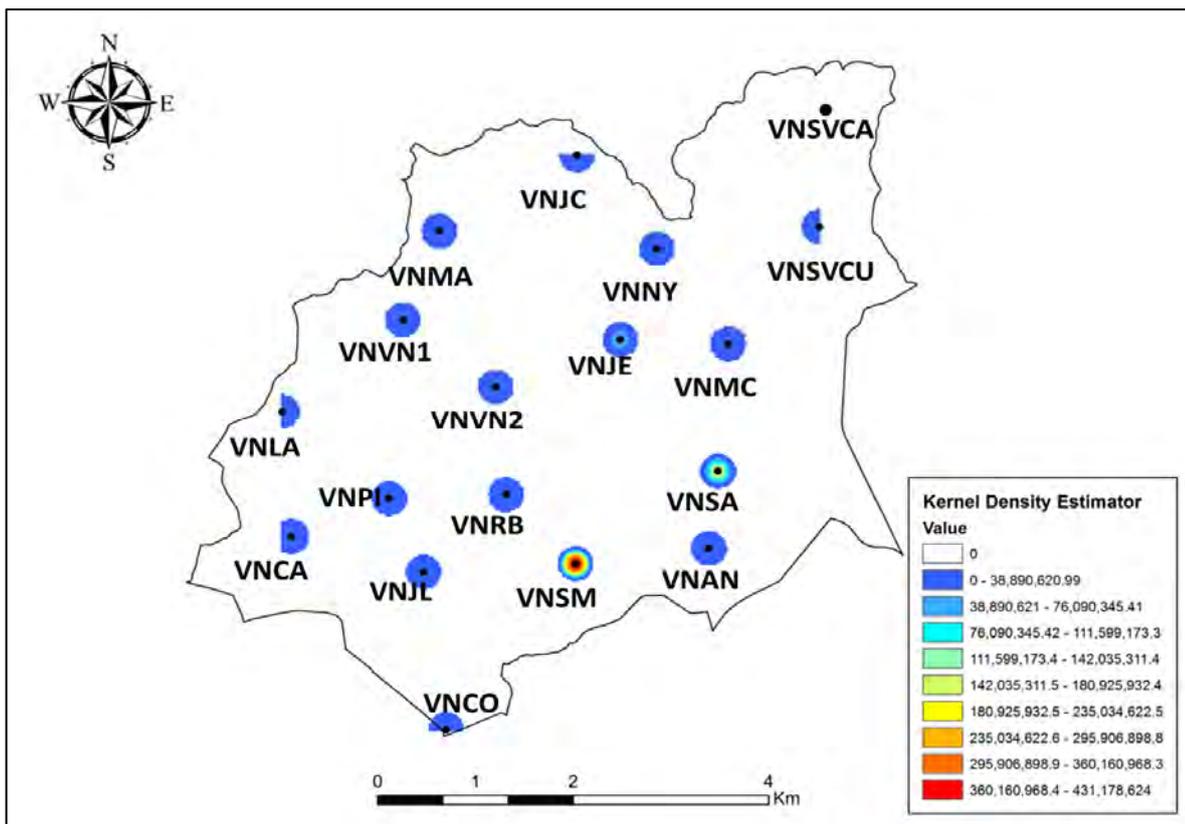
Ano amostral 2														Total de espécimes coletados	% relativa de espécimes por área de abrangência
Áreas de abrangência	ago/12	set/12	out/12	nov/12	dez/12	jan/13	fev/13	mar/13	abr/13	mai/13	jun/13	jul/13			
VNAN	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	0	0	9	1.47	
VNCA	0	0	0	0	1	1	1	0	0	5	2	0	10	1.63	
VNCO	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.16	
VNJC	0	1	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	7	1.14	
VNJE	0	0	0	0	2	0	8	2	0	2	0	3	17	2.77	
VN JL	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	0.49	
VNLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	
VNMA	4	2	0	0	1	0	8	0	0	0	0	0	15	2.45	
VNMC	0	0	1	0	1	0	28	11	1	2	3	1	48	7.83	
VNNY	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	7	1.14	
VNPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.16	
VNRB	1	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	3	9	1.47	
VNSM	0	3	2	0	2	2	0	1	0	1	0	2	13	2.12	
VNSA	1	0	98	0	133	43	4	88	50	0	0	5	422	68.84	
VNSVCU	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.16	
VNVN	0	0	1	5	8	1	1	0	22	4	8	0	50	8.16	
Total	6	8	105	5	150	49	61	104	81	15	15	14	613	100.00	

FONTE: elaborado pelo autor

A distribuição de flebotomíneos no ambiente urbano é desigual no tocante à abundância de espécimes coletados, ocorrendo uma maior quantidade de espécimes em locais com características ambientais mais atrativas como é o caso da localidade VNSM. No entanto, é possível observar que algumas localidades com características ambientais consideradas muito atrativas apresentaram baixo percentual de espécimes coletados, como é o caso de VNSVCU. É importante frisar que *Lu. longipalpis* foi coletada em 15 das 16 áreas de estudo e foi a espécie mais abundante nestas 15 localidades (tabela 2).

O mapa de distribuição de espécies vetoras (suspeitas ou comprovadas) demonstra situação preocupante em todas as áreas de abrangência pois todas registraram a ocorrência de espécies vetoras, no entanto três áreas apresentaram maior acumulação espacial de espécies vetoras: VNSM, VNSA e VNJE (figura 7).

FIGURA 7 - Mapa de Kernel da densidade de espécie vetoras suspeitas e comprovadas coletadas no DS Venda Nova no período de Agosto de 2011 a Julho de 2013



FONTE: elaborado pelo autor

Das 461 fêmeas analisadas 12 apresentaram amplificação positiva na reação para a região intergênica ITS-1. Na tabela 6 está apresentada a dosagem do DNA de algumas amostras para verificação da qualidade do processo de extração, todas as amostras apresentaram parâmetros de dosagem satisfatórios (tabela 4). Para a identificação dos tripanossomatídeos foi utilizada tanto a técnica de PCR-RFLP do ITS-1, como o sequenciamento deste fragmento (quadro 7, figura 8 e 9). Nas amostras onde não foi possível a identificação por estas duas metodologias, foi utilizada a PCR do alvo SSUrRNA.

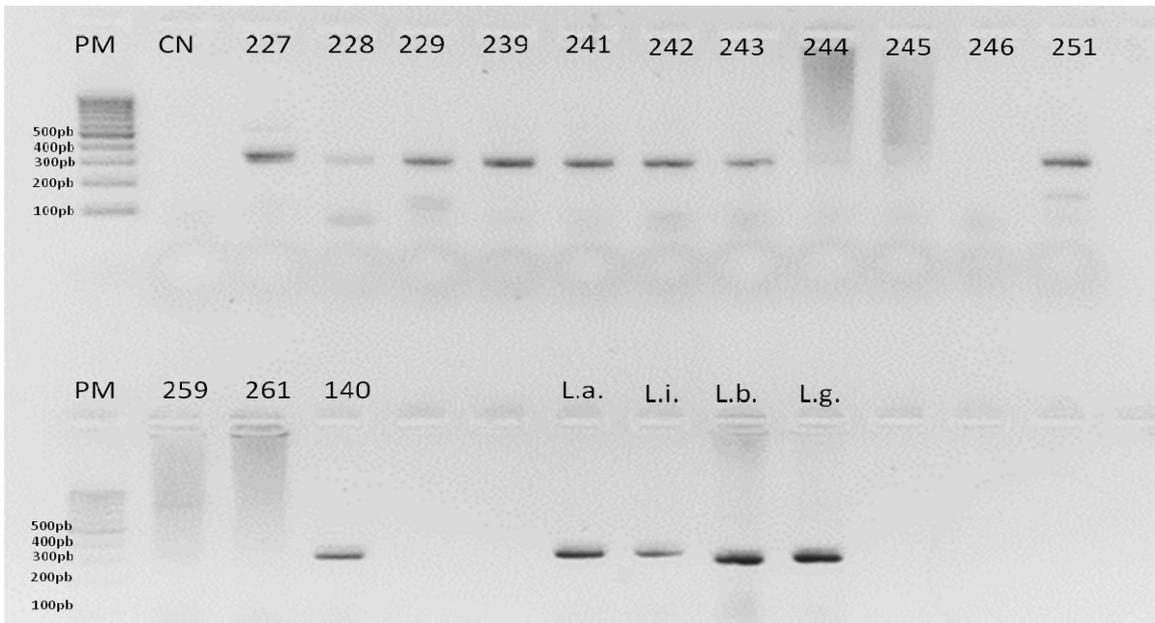
Todas as amostras positivas foram pertencentes à espécie *Lu. longipalpis*. Em quatro amostras foi identificada a presença de DNA de *Le. infantum*, em sete a presença de DNA de *Le. braziliensis* e em uma amostra não foi possível realizar a identificação específica, sendo caracterizada apenas como pertencente à família Tripanossomatidae (quadro 7). Apenas três áreas de abrangência apresentaram espécimes positivos para a detecção de DNA de *Leishmania*: VNSM, VNMC e VNJE. A área VNMC apresentou três espécimes positivos, a área VNSM quatro e a área VNJE apresentou cinco espécimes positivos. Na área VNJE apenas *Le. braziliensis* foi identificada e nas áreas VNSM e VNJE ambas as espécies foram identificadas. A taxa de detecção de DNA de *Leishmania* total no distrito sanitário foi de 2,38%. A taxa total para *Lu. longipalpis* foi de 2,79%. As taxas de infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Le. infantum* e *Le. braziliensis* foram de 1,01% e 1,77% respectivamente.

TABELA 4: Dosagem de DNA das amostras positivas na PCR ITS1 provenientes do Distrito Sanitário Venda Nova

Amostra	Parâmetros considerados			
	ng/ul	A260	A280	260/280
VN 08	85.95	1.719	1.138	1.51
VN 10	57.94	1.159	0.743	1.56
VN 15	76.24	1.525	1.045	1.46
VN 21	61.97	1.239	0.814	1.52
VN 26	9.67	0.193	0.106	1.82
VN 27	49.83	0.997	0.631	1.58
VN 244	160.27	3.205	2.129	1.51
VN 247	13.66	0.273	0.205	1.33
VN 256	95.09	1.902	1.224	1.55
VN 262	21.5	0.43	0.251	1.71

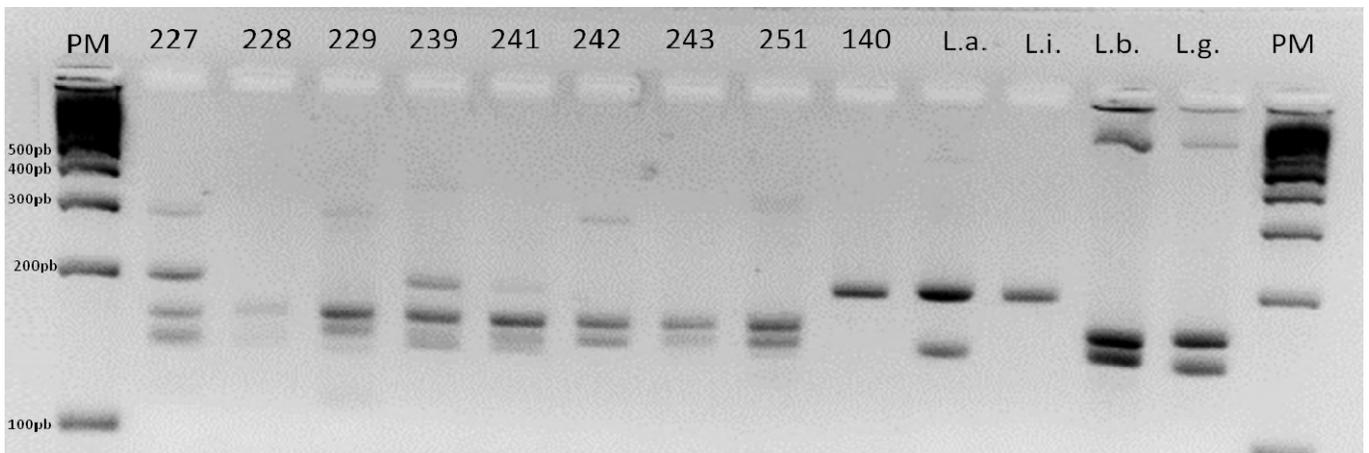
FONTE: elaborado pelo autor

FIGURA 8 - Gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados da reação de PCR que tem como alvo a região de ITS-1 de *Leishmania* em amostras de fêmeas coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CN - controle negativo. Amostras positivas: 227, 228, 229, 239, 241, 242, 243, 251, 140. Amostras negativas: 244, 245, 246, 259, 261. Controles positivos – cepas de referência: La: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Li: *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Lb: *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Lg: *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).



FONTE: elaborado pelo autor

FIGURA 9 - Gel de agarose 4% corado pelo brometo de etídio, mostrando os perfis de restrição da digestão de fragmentos amplificados na reação de PCR que tem como alvo a região de ITS-1 de *Leishmania* em amostras de fêmeas coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb. Amostras positivas: 227, 228, 229, 239, 241, 242, 243, 251, 140. Controles positivos - cepas referência: La: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Li: *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Lb: *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Lg: *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).



FONTE: elaborado pelo autor

QUADRO 7 - Detecção e identificação de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos coletadas no Distrito Sanitário Venda Nova no período de agosto de 2011 a julho de 2013

Espécie de flebotomíneo	Área	PCR-ITS1	RFLP - ITS1	ITS1 Sequenciamento	Nested PCR - SSU RNA	SSU-RNA Sequenciamento
<i>Lu. longipalpis</i>	VNJE	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	baixa qualidade	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNJE	positivo	perfil indefinido	baixa qualidade	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNJE	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	baixa qualidade	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNJE	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	baixa qualidade	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNJE	positivo	perfil indefinido	<i>Le. infantum</i> (ID:94%, Ref: KC998879.1)	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNSM	positivo	perfil indefinido	não realizado	positivo	Complexo donovani - <i>Le. infantum</i> (ID: 99%, Ref:EU825208.1)
<i>Lu. longipalpis</i>	VNSM	positivo	<i>Le. infantum</i>	<i>Le. infantum</i> (ID:100%, Ref: KC347301.1)	positivo	baixa qualidade
<i>Lu. longipalpis</i>	VNSM	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Leishmania</i> sp. (ID: 91%, Ref: HQ830349.1)	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNSM	positivo	não realizado	<i>Le. infantum</i> (ID:88%, Ref: KC998879.1)	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNMC	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Le. braziliensis</i> (ID: 85%, Ref: FN398338.1)	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNMC	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Leishmania</i> sp. (ID: 93%, Ref: FJ753382.1)	não realizado	não realizado
<i>Lu. longipalpis</i>	VNMC	positivo	<i>Le. braziliensis</i>	baixa qualidade	não realizado	não realizado

FONTE: elaborado pelo autor

4.2 Estudo da fauna de flebotomíneos no Parque Estadual do Sumidouro

No Parque Estadual do Sumidouro foram coletados 4.675 espécimes de flebotomíneos pertencentes a nove gêneros e 25 espécies. A razão entre os espécimes machos e fêmeos foi de 0,81:1. A espécie que apresentou maior abundância foi *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), cujos exemplares representaram 37,54 % do total coletado. As espécies *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) e *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940) apresentaram porcentagens relativas de 22,67% e 9,52 % respectivamente (tabela 5).

Os valores de riqueza e diversidade de espécies foram relativamente elevados em todas as amostragens realizadas no parque (tabela 6). A curva de acumulação de espécies atingiu a saturação na 16ª campanha de amostragem e o valor estabilizou em 25 espécies (tabela 7). Os tipos de ambientes amostrados apresentaram valores distintos para os índices ecológicos avaliados. Estes dados associados à descrição ambiental do Parque demonstram que mesmo em uma pequena área amostrada, o parque possui grande plasticidade ambiental e faunística, no tocante aos flebotomíneos (quadro 2, tabelas 5, 6 e 7).

A área Cerrado 1 (Mata semi-decídua) apresentou os valores mais elevados de índices de diversidade, seguida pela área Cerrado 2 (Mata decídua) e ambas apresentaram elevados valores de equitabilidade. As localidades com valores mais baixos de riqueza e equitabilidade foram a entrada da gruta do sumidouro e a área rupícola, no entanto estas áreas apresentaram os valores mais elevados de abundância relativa de espécimes. A área de vegetação rupícola e a entrada da gruta apresentaram 32% e 36% do total de espécimes coletados respectivamente (tabela 7).

TABELA 5 - Total de flebotomíneos coletados por sexo e ambiente de estudo, no Parque Estadual do Sumidouro, no período de setembro de 2011 a agosto de 2013.

Espécie	Locais de estudo						Sexo		Total (%)
	Entorno do parque	Cerrado 1	Cerrado 2	Área rupícola	Entrada da Caverna	Entorno da Caverna	♂	♀	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	33	12	0	0	3	29 (0.62)	19 (0.41)	48 (1.03)
<i>Brumptomyia pintoii</i>	0	6	7	0	1	0	8 (0.17)	6 (0.13)	14 (0.30)
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	10	4	1	3	6	-	24 (0.51)	24 (0.51)
Complexo mamedei	1	22	11	10	1	3	-	48 (1.03)	48 (1.03)
Complexo cortelezii	57	5	57	11	23	15	-	168 (3.59)	168 (3.59)
<i>Evandromyia bacula</i>	0	1	0	1	0	1	-	3 (0.06)	3 (0.06)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	62	1	25	22	17	10	122 (2.61)	15 (0.32)	137 (2.93)
<i>Evandromyia lenti</i>	5	2	12	2	0	1	10 (0.21)	12 (0.26)	22 (0.47)
<i>Evandromyia sallesi</i>	24	2	24	14	2	3	3 (0.06)	66 (1.14)	69 (1.48)
<i>Evandromyia spelunca</i>	2	0	0	0	1	0	-	3 (0.06)	3 (0.06)
<i>Evandromyia termithophila</i>	2	6	10	0	0	0	6 (0.13)	12 (0.26)	18 (0.39)
<i>Evandromyia</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1 (0.02)	-	1 (0.02)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1	3	20	57	152	17	134 (2.87)	116 (2.48)	250 (5.35)
<i>Lutzomyia renei</i>	1	5	4	18	1021	11	574 (12.28)	486 (10.40)	1060 (22.67)
<i>Lutzomyia</i> sp.	4	14	8	14	20	5	40 (0.86)	25 (0.53)	65 (1.39)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	1	50	1258	359	85	687 (14.70)	(22.84)	1755 (37.54)
<i>Migonemyia migonei</i>	11	0	8	4	19	5	14 (0.30)	33 (0.71)	47 (1.01)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	7	2	4	9	11	24	16 (0.34)	41 (0.88)	57 (1.22)
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	1	0	1	1	0	2 (0.04)	1 (0.02)	3 (0.06)
<i>Nyssomyia</i> sp.	0	1	0	0	0	0	-	1 (0.02)	1 (0.02)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	3	11	8	7	23	21	11 (0.24)	62 (1.33)	73 (1.56)
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	14	5	3	0	0	11 (0.24)	11 (0.24)	22 (0.47)
<i>Pintomyia fischeri</i>	0	4	2	4	0	1	5 (0.11)	6 (0.13)	11 (0.24)
<i>Pintomyia mamedei</i>	0	3	0	1	0	0	-	4 (0.09)	4 (0.09)
<i>Pintomyia monticola</i>	0	1	2	2	0	1	1 (0.02)	5 (0.11)	6 (0.13)
<i>Pintomyia pessoai</i>	4	227	106	63	4	41	294 (6.29)	151 (3.23)	445 (9.52)
<i>Pintomyia</i> sp.	0	1	1	0	0	0	1 (0.02)	1 (0.02)	2 (0.04)
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	67	5	1	0	1	39 (0.83)	35 (0.75)	74 (1.58)
<i>Psathyromyia aragaoi</i> c.f.	0	3	0	0	0	0	-	3 (0.06)	3 (0.06)
<i>Psathyromyia barretoii barretoii</i>	0	5	0	0	0	0	-	5 (0.11)	5 (0.11)
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	22	10	0	0	0	13 (0.28)	19 (0.41)	32 (0.68)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	5	93	17	5	5	4	51 (1.09)	78 (1.67)	129 (2.76)
<i>Psathyromyia</i> sp.	0	1	0	0	0	0	-	1 (0.02)	1 (0.02)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	8	14	3	24	25	18 (0.39)	57 (1.22)	75 (1.60)
Total	192 (4,11)	575 (12,30)	426 (9,11)	1511 (32,32)	1688 (36,11)	283 (6,05)	2090 (44,71)	2585 (55,29)	4675 (100,00)

FONTE: elaborado pelo autor

Não houve uma única espécie que dominasse todos os ambientes de estudo no parque. Por exemplo, nos arredores do parque (ambiente peri-domiciliar) foi coletado um número elevado de espécimes do complexo *cortelezzii* e da espécie *Evandromyia cortelezzii*. Nas áreas de mata decídua e semi-decídua a espécie mais coletada foi *Pi. pessoai*; *Mi. quinquefer* foi a espécie mais abundante na área rupícola e nos arredores da grutas e *Lu. renei* foi mais abundante na entrada da gruta. As espécies *Lu. longipalpis*, *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Ny. whitmani* foram registradas em todos os locais amostrados. As espécies *Migonemyia migonei* (France, 1920) e *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926) foram coletadas em cinco e quatro das áreas de estudo, respectivamente (tabela 5, 6 e 7).

TABELA 6 - Índices de diversidade e equitabilidade por local de coleta no PE Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013

Índices	Locais de coleta					
	Entorno do Parque	Cerrado 1	Cerrado 2	Vegetação Rupícola	Entrada da caverna	Entorno da caverna
Índice de diversidade de Margalef	2.671	3.52	3.251	2.467	1.756	2.889
Índice de Equitabilidade J	0.6749	0.6068	0.8145	0.2471	0.4382	0.7478

FONTE: elaborado pelo autor

TABELA 7: Valores de acumulação de espécies, abundância e riqueza específica de flebotomíneos por coleta realizada no PE Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013

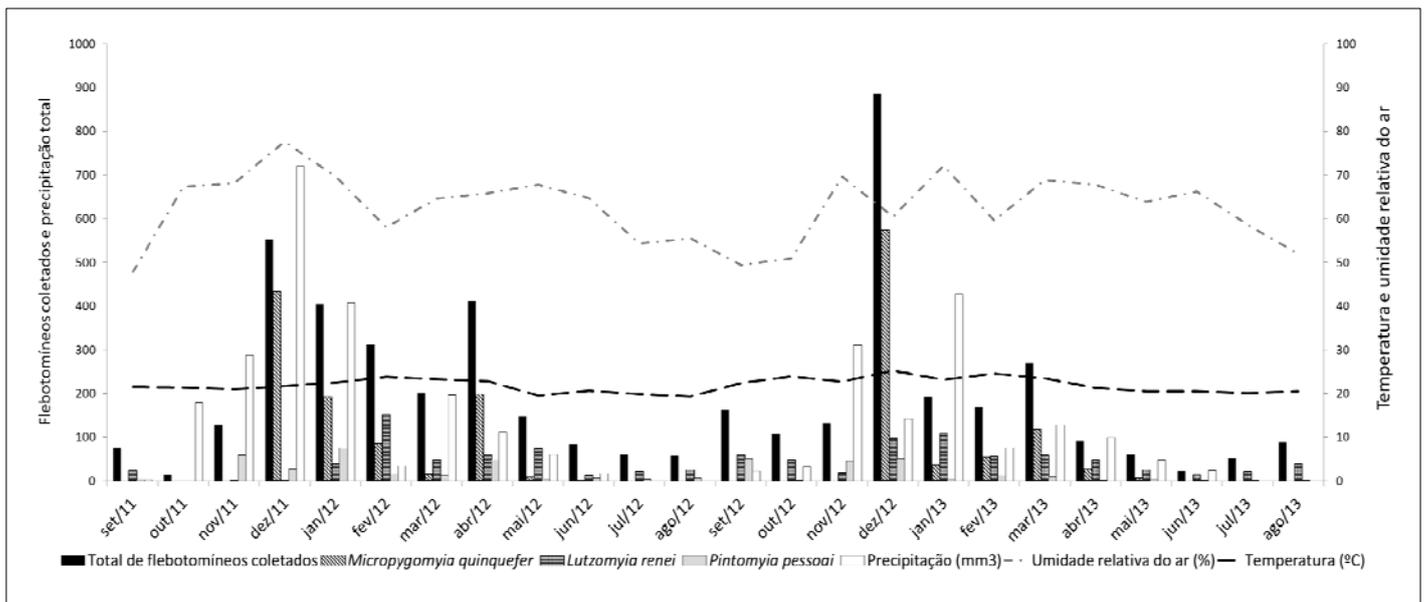
Coletas	Primeiro ano amostral											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
Riqueza	13	5	14	18	16	19	15	16	12	12	10	10
Acumulação de espécies	13	13	17	21	22	23	23	23	23	23	23	23
Margalef	2.82	1.61	2.68	2.70	2.53	3.16	2.68	2.51	2.22	2.57	2.20	2.22
Equitability_J	0.84	0.92	0.69	0.34	0.60	0.52	0.76	0.62	0.68	0.87	0.80	0.75
Coletas	Segundo ano amostral											
	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°
Riqueza	13	10	11	18	13	12	11	8	11	7	7	13
Acumulação de espécies	23	23	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Margalef	2.41	2.06	2.14	2.54	2.32	2.18	1.83	1.56	2.44	1.94	1.54	2.71
Equitability_J	0.61	0.60	0.71	0.39	0.50	0.64	0.63	0.60	0.77	0.61	0.74	0.71

FONTE: elaborado pelo autor

No Parque Estadual do Sumidouro uma maior abundância de flebotomíneos foi registrada no primeiro ano de coleta. No entanto, em ambos os anos de estudo, os períodos com maiores registros de espécimes foram os meses de dezembro a abril e os com menores registros foram os meses de junho e julho. A curva de variação sazonal dos flebotomíneos no Parque não foi determinada por uma única espécie. Mesmo as espécies que apresentaram maiores taxas de abundância relativa *Mi. quinquefer* e *Lu. renei*, não influenciam de forma preponderante o padrão da curva (gráfico 2).

A análise da curva sazonal em conjunto com os parâmetros climáticos mostra que os picos de coleta ocorrem nos meses quentes e chuvosos. Apenas a umidade relativa do ar não apresentou correlação estatisticamente significativa com a curva sazonal [Temperatura (p-valor < 0.0001 – Serman correlation test), Precipitação (p-valor =0.0013 – Serman correlation test), Umidade relativa do ar (p-valor =0.0984 – Serman correlation test)].

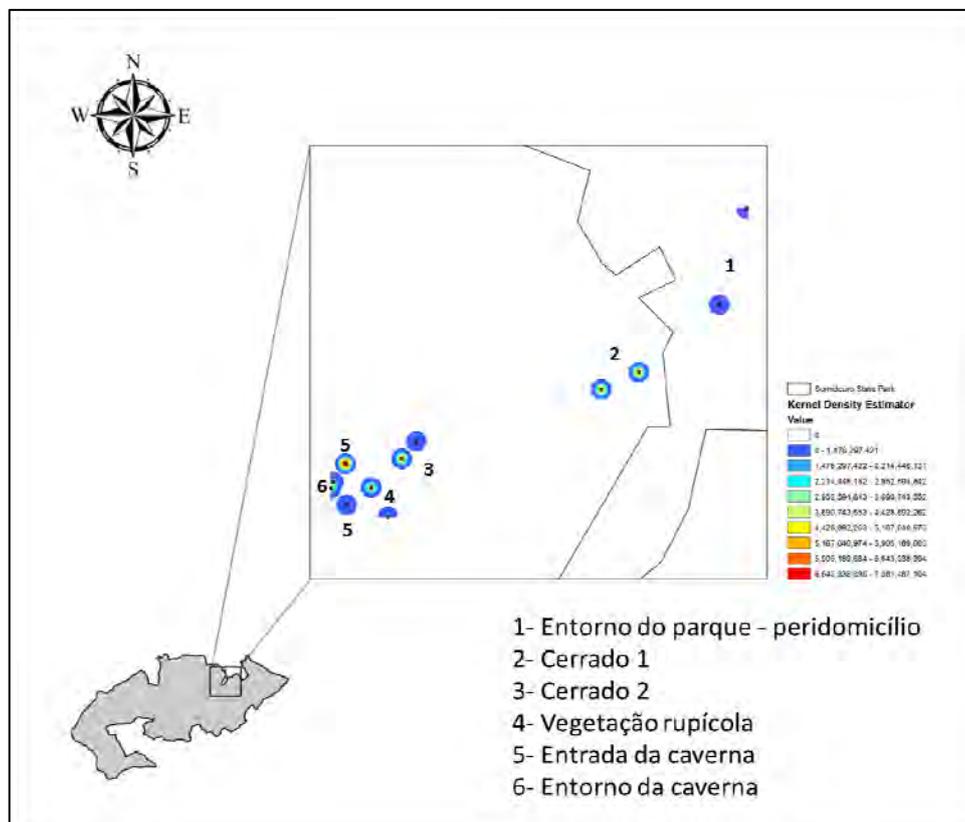
GRÁFICO 2 - Variação sazonal de flebotomíneos e dos parâmetros climáticos precipitação total, umidade relativa do ar e temperatura média no Parque Estadual do Sumidouro no período de setembro de 2011 a agosto de 2013.



FONTE: elaborado pelo autor

Espécies vetoras de *Leishmania* foram registradas em todos os ambientes estudados do Parque Estadual do Sumidouro, com a maior concentração destas espécies na entrada da gruta e nas áreas de vegetação decídua e semi-decídua (Cerrado 1 e 2). A área de vegetação rupícola apresentou uma densidade intermediária e o peridomicílio apresentou a menor concentração de espécimes pertencentes a espécies vetoras (figura 10).

FIGURA 10 - Mapa de Kernel da densidade de espécie vetoras suspeitas e comprovadas coletadas no PE Sumidouro no período de Setembro de 2011 a Agosto de 2013



FONTE: elaborado pelo autor

Um total de 2.380 fêmeas coletadas no Parque Estadual do Sumidouro foi submetido à detecção de DNA de *Leishmania*, destas 1.014 foram processadas de forma individual e 1.366 foram agrupadas em 153 pools de acordo com a espécie, o local e a data de coleta. Todas as amostras apresentaram resultado satisfatório no procedimento de dosagem de DNA (tabela 8). Apenas quatro espécimes apresentaram reação positiva na PCR dirigida ao alvo ITS-1, todas processadas de maneira individual (figura 11). Para estas amostras os resultados da RFLP com a enzima Hae III foram insatisfatórios dada a baixa concentração de DNA obtida. A identificação dos fragmentos foi realizada através da técnica de sequenciamento. Apenas uma amostra proveniente de uma fêmea do complexo *cortezii* foi identificada como *Le. braziliensis*. Duas amostras foram identificadas como *Crithidia fasciculata* e foram provenientes de uma fêmea da espécie *Ev. sallesi* e outra da espécie *Pa. lutziana*. Uma fêmea da espécie *Sc. sordellii* apresentou detecção positiva para tripanossomatídeos (quadro 8). A taxa de infecção natural

do complexo cortelezzi para *Le. braziliensis* foi de 0,62%. E a taxa de infecção geral no parque foi de 0,04%.

TABELA 8 - Amostragem de resultados da dosagem de DNA de amostras provenientes do Parque Estadual do Sumidouro

Amostra	Parâmetros considerados			
	ng/ul	A260	A280	260/280
S 003	4.33	0.087	0.079	1.1
S 004	10.2	0.204	0.15	1.36
S 016	37.7	0.754	0.474	1.59
S 021	58.02	1.16	0.665	1.74
S 025	115.08	2.302	1.59	1.45
S 032	59.76	1.195	0.715	1.67
S 038	10.31	0.206	0.119	1.73
S 044	49.6	0.992	0.653	1.52
S 049	55.92	1.118	0.735	1.52
S 060	17.48	0.35	0.237	1.47

FONTE: elaborado pelo autor

FIGURA 11 - Gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR ITS-1 de *Leishmania* em amostra de fêmea coletada no Parque Estadual do Sumidouro. Canaletas: PM - peso molecular de 100pb; CN - controle negativo. Amostra positiva:892. Amostras negativas: 893 a 925. CP - controle positivo : *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).



FONTE: elaborado pelo autor

QUADRO 8 - Resultados de detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos coletadas no PES no período de Setembro de 2011 a Agosto de 2012

Espécies	Local de coleta	Data de coleta	ITS1-PCR	RFLP	Sequenciamento
<i>Ev. sallesi</i>	Entorno do parque / peridomicílio	mar/12	Positivo	Indefinido	<i>Crithidia fasciculata</i> (id: 100%, ref: HM004585.1)
<i>Pa. lutziana</i>	Entorno do parque / peridomicílio	mar/12	Positivo	Indefinido	<i>Crithidia fasciculata</i> (id: 100%, ref: HM004585.1)
<i>Sc. sordellii</i>	Entorno da caverna	mar/12	Positivo	Indefinido	Trypanosomatidae (id: 93%, ref: JN673399.1)
Complexo cortezezzii	Cerrado 2	dez/12	Positivo	Indefinido	<i>Leishmania braziliensis</i> (id: 100%, ref: JX448549.1)

FONTE: elaborado pelo autor

4.3 Comparação da composição da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro

A riqueza e a diversidade das espécies nas áreas de estudo foram muito distintas. Mesmo com um esforço amostral consideravelmente menor a região do PE do Sumidouro apresentou valores de riqueza, diversidade, abundância e equitabilidade muito mais elevados. Em todas as amostragens realizadas os valores de diversidade e riqueza foram mais elevados no Parque Estadual do Sumidouro (tabelas: 1, 2, 5 e 6, gráfico 3).

O PE do Sumidouro atingiu a saturação da curva de riqueza na 16^o amostragem e o valor se estabilizou em 25 espécies, já o DS Venda Nova atingiu a saturação na 19^o coleta, com apenas oito espécies coletadas (gráfico 3). Estes dados aliados à curva sazonal das localidades tornam evidente a dominância de *Lu. longipalpis* no ambiente urbano.

As tabelas 1 e 2 apresentam as diferentes características ambientais encontradas na área urbana e na área silvestre. Os perfis ambientais da área urbana demonstram a homogeneização no DS Venda Nova provavelmente acarretada pelo processo de urbanização.

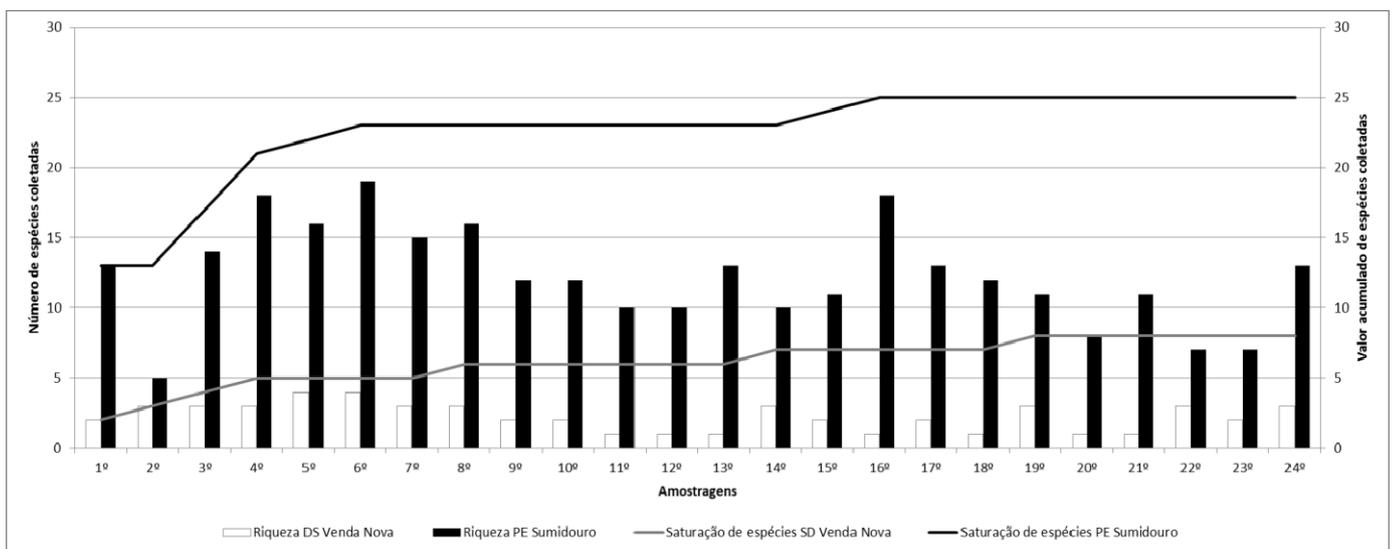
A análise conjunta das tabelas 1 e 7 mostra que a distribuição de flebotomíneos no ambiente urbano é desigual no tocante à abundância de espécimes coletados, ocorrendo uma maior quantidade em locais com características ambientais mais atrativas para os flebotomíneos como é o caso da Localidade VNSM.

O quadro 2 apresenta os dados ambientais do PE do Sumidouro e é possível observar que o ambiente silvestre, mesmo em uma pequena área amostrada apresenta significativa plasticidade ambiental. Os seis locais amostrados apresentam diferenças marcantes, principalmente quanto à

composição vegetal das áreas. A análise das tabelas 5, 6 e 7 evidencia a maior riqueza, diversidade e equitabilidade do PE do Sumidouro.

Os mapas de distribuição das espécies vetoras mostram a preocupante situação epidemiológica em ambas as áreas de estudo. No DS Venda Nova há uma dispersão espacial de *Lu. longipalpis* em toda a área da regional. No PE do Sumidouro também há a distribuição de vetores em todos os locais de estudo, com concentração nas áreas de cerrado, vegetação rupícola e no entorno e entrada das grutas. O ambiente de entorno apresentou baixos valores de densidade vetorial (figuras 7 e 10).

GRÁFICO 3 - Variação das taxas de riqueza e curva de saturação de espécies no Distrito Sanitário Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro no período de agosto de 2011 a agosto de 2013



FONTE: elaborado pelo autor

4.4 Comparação morfométrica e da composição de feromônios sexuais das populações de *Lu. longipalpis* do Parque Estadual do Sumidouro e do Distrito Sanitário Venda Nova

Considerando as medidas morfométricas, para os exemplares fêmeas houve diferença significativa na comparação das médias de oito (17,4%) caracteres em 45 analisados e na comparação de variâncias de seis (13,0%) caracteres. A comparação das medidas dos exemplares machos apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação das médias em 13 (25%) dos 52 caracteres analisados, e em 15 (28,8%) dos caracteres na comparação das variâncias (Tabelas 17 e 18). Dados que apontam a maior homogeneidade das características morfométricas das fêmeas em relação aos machos. Os machos apresentaram diferenças em caracteres que compõe estruturas da cabeça, do tórax, abdômen, pernas e

genitália. As fêmeas apresentaram diferenças em estruturas que compõe a cabeça, o tórax e a genitália. Os espécimes da área urbana apresentaram maiores amplitudes de medidas morfológicas que os espécimes da área protegida. O que indica maior variância fenotípica que foi estatisticamente demonstrada para alguns caracteres (tabelas 9 e 10).

A análise de componentes principais corrobora os resultados das análises de comparação através dos testes estatísticos T e F. Como pode ser observado nas figuras 12 e 13 tanto os machos, como as fêmeas não formam grupamentos distintos morfológicamente ao se comparar as medidas dos caracteres para as populações do Distrito Sanitário Venda Nova e do Sumidouro. Os dendogramas de similaridade reforçam a similaridade das características morfológicas das populações. No entanto, é possível perceber que as fêmeas formam um grupo com maior homogeneidade que os machos. O que pode ser claramente avaliados pelo posicionamento dos espécimes no dendograma como pela maior sobreposição observada entre os grupos de fêmeas para os espaços de ordenação de componentes principais.

TABELA 9 - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares de fêmeas das populações de *Lu. longipalpis* estudadas.

CARACTERES	Distrito Sanitário Venda Nova				Parque Estadual do Sumidouro				Teste T	Teste F
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão		
Comprimento da cabeça	254.80	327.60	292.13	23.22	260.40	319.20	291.01	16.47	0.88	0.2115
Largura da cabeça	375.80	501.10	428.22	36.73	341.70	444.20	396.33	33.14	0.0187	0.7055
Comprimento da distância interocular	98.00	142.80	128.45	10.50	86.80	137.20	116.85	14.29	0.0172	0.2617
Comprimento do clipeo	120.40	176.40	146.16	14.67	128.80	159.60	148.21	10.66	0.6644	0.2443
Largura do clipeo	89.60	126.00	104.53	10.61	89.60	123.20	101.36	9.11	0.3873	0.5758
Comprimento do olho	207.20	271.60	237.44	24.18	204.40	285.60	232.72	23.85	0.5948	0.9603
Largura do olho	114.80	215.60	158.85	23.67	117.60	159.60	143.55	12.89	0.0363	0.0299
Comprimento do Labroepifaringe	266.00	375.20	317.71	31.97	268.80	361.20	321.81	28.24	0.7121	0.6492
Comprimento da antena III	210.00	274.40	244.36	19.02	215.60	271.60	245.65	16.78	0.8449	0.6452
Comprimento da antena IV	103.60	126.00	114.24	6.71	98.00	128.80	114.61	9.43	0.9015	0.2147
Comprimento da antena V	98.00	120.40	109.76	7.34	98.00	126.00	110.32	8.90	0.8523	0.4811
Comprimento da antena XV	98.00	117.60	106.40	6.77	92.40	117.60	106.21	7.95	0.9453	0.5572
Comprimento da antena XVI	98.00	117.60	105.65	6.30	85.60	114.80	103.71	8.73	0.4898	0.234
Comprimento do palpo 1	39.20	67.20	50.59	8.49	33.60	61.60	47.60	7.48	0.3157	0.6409
Comprimento do palpo 2	114.80	179.20	150.83	16.49	114.80	168.00	145.79	14.52	0.3821	0.6416
Comprimento do palpo 3	154.00	210.00	182.75	16.98	156.80	221.20	182.56	15.95	0.9755	0.8183
Comprimento do palpo 4	126.00	187.60	158.29	17.09	114.80	170.80	142.24	16.63	0.0145	0.9212
Comprimento do palpo 5	310.80	537.60	418.51	67.71	196.00	478.80	308.75	78.69	0.0003	0.5814
Comprimento do mesonoto	592.20	831.40	697.77	72.10	569.50	785.90	671.90	66.10	0.3144	0.7496
Comprimento da asa	1867.90	2505.80	2,152.67	190.12	1879.30	2539.90	2105.58	608.58	0.148	0.8947
Largura da asa	535.30	751.70	628.10	60,571	546.70	694.70	579.34	168.10	0.7297	0.6179
Comprimento da alfa	378.00	509.60	410.67	117.82	308.00	509.60	414.40	128.63	0.8291	0.032
Comprimento da beta	221.20	369.60	297.92	42.61	266.00	397.60	287.65	88.77	0.5134	0.8829
Comprimento da gama	322.00	1469.30	471.29	279.87	338.80	445.20	371.09	106.67	0.3364	< 0.0001
Comprimento da delta	56.00	106.40	76.91	26.15	58.80	134.40	98.37	35.68	0.0059	0.1461
Comprimento da R5	888.40	1719.80	1,426.73	183.42	1298.40	1708.50	1417.63	406.85	0.1175	0.086

TABELA 9 – CONTINUAÇÃO - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares de fêmeas das populações de *Lu. longipalpis* estudadas.

CARACTERES	Distrito Sanitário Venda Nova				Parque Estadual do Sumidouro				Teste T	Teste F
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão		
Comprimento do fêmur mediano	706.10	911.20	596.81	376.66	683.40	911.20	695.53	290.84	0.702	0.6855
Comprimento do fêmur posterior	808.60	1082.00	671.97	423.75	808.60	1025.10	748.67	393.46	0.5367	0.8157
Comprimento da tíbia anterior	706.10	1184.50	714.50	315.83	717.50	888.40	705.38	290.36	0.7951	0.0023
Comprimento da tíbia mediana	899.80	1116.20	731.97	460.59	831.40	1139.00	892.94	371.29	0.3314	0.4787
Comprimento da tíbia posterior	1184.50	1492.00	956.72	602.78	1127.60	1435.10	1063.05	556.00	0.5429	0.8166
Comprimento do tarsômero 1 anterior	398.60	615.00	400.13	172.18	387.20	489.70	361.41	189.33	0.6246	0.0477
Comprimento Do tarsômero 1 mediano	489.70	580.80	389.51	244.47	466.90	603.60	443.41	232.47	0.1473	0.3161
Comprimento do tarsômero 1 posterior	626.40	751.70	499.61	313.29	592.20	820.00	525.09	332.41	0.1383	0.0664
Comprimento do tarsômero 2 anterior	398.60	706.10	492.01	211.90	535.30	672.00	482.91	252.84	0.1659	0.0684
Comprimento do tarsômero 2 mediano	569.50	740.30	466.21	294.57	206.10	706.10	492.09	282.15	0.6458	0.0065
Comprimento do tarsômero 2 posterior	672.00	797.30	541.38	340.27	637.80	854.20	517.83	382.37	0.1273	0.3807
Comprimento do abdômen	1104.80	2403.20	1,670.50	390.42	1298.40	2278.00	1643.17	293.07	0.8299	0.295
Comprimento da cerca	114.80	156.80	134.77	12.73	126.00	182.80	137.63	41.88	0.0371	0.2042
Comprimento da espermateca	25.20	42.00	33.79	4.54	19.60	39.20	14.03	15,718	0.0157	0.46
Largura da espermateca	8.40	11.20	9.89	1.44	5.60	11.20	4.48	5.05	0.0872	0.1332
Comprimento do ducto individual	100.80	215.60	161.09	33.83	109.20	184.80	42.93	74.97	0.3291	0.8786
Largura do ducto individual	2.80	2.80	2.80	4.49	2.80	2.80	0.75	1.28	Valores iguais	Valores iguais
Comprimento do ducto comum	11.20	64.40	26.87	14.38	19.60	50.40	4.85	12.85	0.3547	0.8438
Largura do ducto comum	2.80	8.40	4.67	2.02	2.80	8.40	0.75	2.23	0.2369	0.1725

FONTE: elaborado pelo autor

TABELA 10 - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares machos das populações de *Lu. longipalpis* estudadas

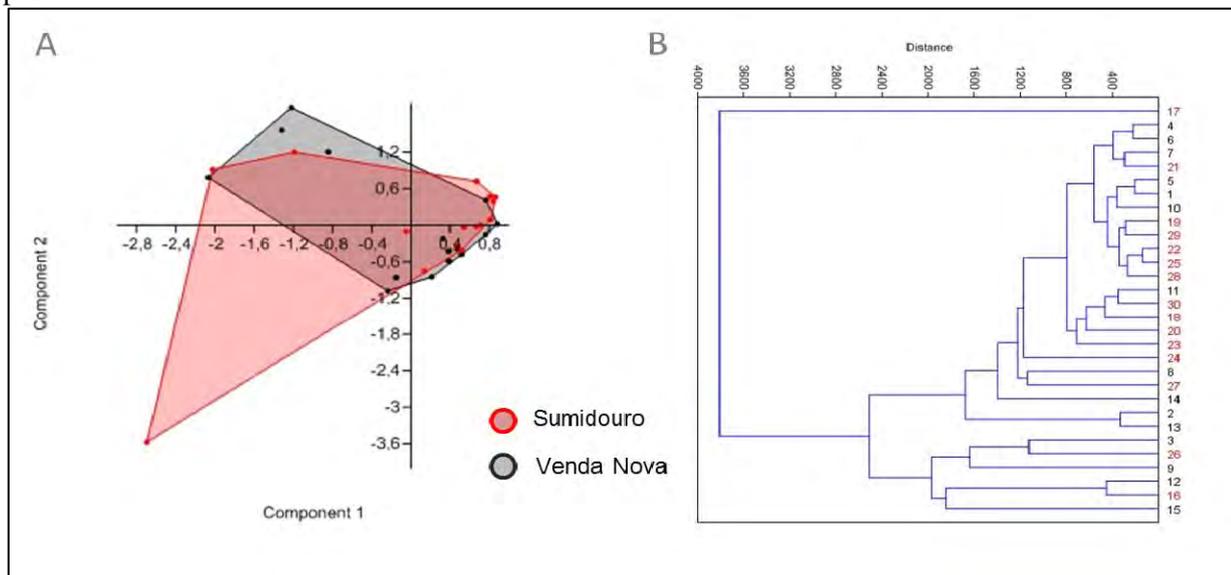
CARACTERES	Distrito Sanitário Venda Nova				Parque Estadual do Sumidouro				Teste T	Teste F
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão		
Comprimento da cabeça	260.40	420.00	288.73	39.15	280.00	310.80	294.75	9.43	0.5672	0.0001
Largura da cabeça	387.20	512.50	428.53	40.24	341.70	432.80	390.25	22.97	0.0034	0.0444
Comprimento da distância interocular	100.80	128.80	117.93	7.63	103.60	131.60	119.65	8.50	0.5642	0.691
Comprimento do clipeo	120.40	156.00	141.15	9.32	120.40	154.00	140.37	9.92	0.8275	0.8192
Largura do clipeo	81.20	145.60	95.95	15.71	81.20	98.00	89.05	5.42	0.1195	0.0003
Comprimento do olho	210.00	260.60	237.80	15.17	193.20	268.80	242.29	19.05	0.4806	0.4043
Largura do olho	120.40	207.20	157.67	19.33	126.00	168.00	142.80	13.35	0.0207	0.1781
Comprimento do Labroepifaringe	198.80	280.00	255.52	20.75	131.60	274.40	248.65	34.08	0.5102	0.0736
Comprimento da antena III	266.00	336.00	305.19	20.32	291.20	344.40	318.83	19.34	0.0702	0.8554
Comprimento da antena IV	123.20	156.80	140.75	8.56	134.40	198.80	147.47	15.47	0.1522	0.0343
Comprimento da antena V	114.80	145.60	134.56	7.74	126.00	145.60	137.76	6.54	0.2315	0.5372
Comprimento da antena XV	114.80	154.00	131.75	9.55	123.20	164.40	133.97	9.97	0.5373	0.876
Comprimento da antena XVI	112.00	154.00	127.87	11.33	114.80	134.40	128.05	5.24	0.9542	0.0066
Comprimento do palpo 1	33.60	56.00	41.44	6.37	36.40	56.00	44.61	5.94	0.169	0.7969
Comprimento do palpo 2	98.00	145.60	130.67	13.03	126.00	142.80	135.33	6.05	0.2188	0.0069
Comprimento do palpo 3	154.00	193.20	172.67	11.72	162.40	196.00	179.01	10.61	0.1312	0.7139
Comprimento do palpo 4	117.60	168.00	141.48	13.19	114.80	187.60	151.01	16.92	0.0962	0.3625
Comprimento do palpo 5	98.00	436.80	221.00	133.26	112.00	456.40	347.57	88.24	0.0183	0.4988
Comprimento do mesonoto	515.00	785.90	660.50	70.26	569.50	672.00	611.97	31.79	0.0214	0.0054
Comprimento da asa	1822.40	2278.00	2040.43	135.26	1890.70	2289.30	2093.42	110.26	0.2495	0.4542
Largura da asa	489.70	637.80	580.06	42.03	558.10	626.40	599.03	22.72	0.1354	0.0281
Comprimento da alfa	375.20	543.20	419.33	42.25	366.80	558.10	423.54	47.63	0.7999	0.6602
Comprimento da beta	226.80	322.00	272.09	27.87	274.40	336.00	298.01	17.79	0.0052	0.1043
Comprimento da gama	347.20	666.40	482.53	113.12	291.20	641.20	391.71	83.13	0.0183	0.2612
Comprimento da delta	22.40	134.40	73.87	25.79	33.60	103.60	71.63	19.36	0.7899	0.2947
Comprimento da R5	1366.80	1765.00	1479.11	113.99	1275.60	1845.10	1452.49	131.79	0.5587	0.5944

TABELA 10 – CONTINUAÇÃO - Resultados das análises morfométricas, mostrando por caráter analisado os respectivos valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões dos exemplares machos das populações de *Lu. longipalpis* estudadas

CARACTERES	Distrito Sanitário Venda Nova				Parque Estadual do Sumidouro				Teste T	Teste F
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão		
Comprimento do fêmur anterior	694.70	854.20	738.77	211.14	740.30	888.40	769.92	216.77	0.0825	0.3353
Comprimento do fêmur mediano	683.40	1013.70	815.43	79.18	740.30	945.30	817.76	51.86	0.9248	0.1252
Comprimento do fêmur posterior	808.60	968.10	907.35	53.72	763.10	1104.80	950.51	80.06	0.094	0.1476
Comprimento da tíbia anterior	774.50	968.10	830.68	236.23	831.40	990.90	855.75	241.53	0.1947	0.636
Comprimento da tíbia mediana	888.40	1207.30	1095.69	88.67	1093.40	1264.20	1164.03	57.46	0.0183	0.1162
Comprimento da tíbia posterior	1173.10	1480.70	1388.74	87.53	1166.20	1594.60	1447.51	111.60	0.1198	0.3741
Comprimento do tarsômero 1 anterior	410.00	569.50	451.73	131.32	478.30	546.70	479.85	134.54	0.0257	0.0358
Comprimento Do tarsômero 1 mediano	512.50	649.20	583.85	37.36	569.50	683.40	623.37	29.36	0.0032	0.378
Comprimento do tarsômero 1 posterior	626.40	831.40	723.57	53.75	603.60	820.00	745.59	54.27	0.2736	0.9715
Comprimento do tarsômero 2 anterior	250.50	728.90	514.78	178.13	546.70	660.60	573.25	161.28	0.0521	< 0.0001
Comprimento do tarsômero 2 mediano	296.10	717.50	568.65	182.89	592.20	728.90	676.59	37.96	0.0189	0.0013
Comprimento do tarsômero 2 posterior	330.30	933.90	712.15	137.83	637.80	888.40	789.67	62.64	0.0572	0.0056
Comprimento do coxito	308.00	380.80	346.83	25.13	336.00	422.80	385.84	23.67	0.0002	0.8258
Largura do coxito	84.00	134.40	114.00	11.66	103.60	140.00	120.64	10.15	0.1074	0.6114
Comprimento Parâmetro	142.80	187.00	154.15	10.69	140.00	168.00	155.84	7.22	0.615	0.1541
Largura do Parâmetro	33.00	70.00	55.77	8.93	47.60	78.40	66.45	7.95	0.0018	0.6706
Comprimento Edeago	126.00	190.40	141.87	15.40	131.60	151.20	140.19	6.39	0.6993	0.0022
Largura Edeago	33.60	70.00	54.26	10.63	33.60	67.20	52.08	10.30	0.573	0.9085
Comprimento lobo lateral	366.80	468.40	409.19	31.39	366.80	450.90	399.10	20.21	0.3043	0.1109
Largura lobo lateral	28.00	42.00	36.21	3.58	33.60	39.20	36.21	2.24	1	0.0886
Bomba ejaculatória	126.00	165.20	141.28	9.96	120.40	148.40	135.52	8.45	0.0987	0.5482
Pistão	103.60	145.60	116.08	10.08	100.80	126.00	114.80	7.63	0.6979	0.31
Câmara	36.40	50.40	44.19	3.54	33.60	56.00	41.79	5.32	0.1568	0.1394
Ducto ejaculatório	366.80	467.60	435.64	27.37	383.60	565.60	450.24	50.64	0.3343	0.028
Comprimento do abdome	990.90	1890.70	1268.76	268.29	1674.30	2129.30	1879.93	152.89	< 0.0001	0.0437
Comprimento do gonóstilo	179.20	207.20	192.45	7.81	187.60	210.00	197.31	6.77	0.0796	0.5982

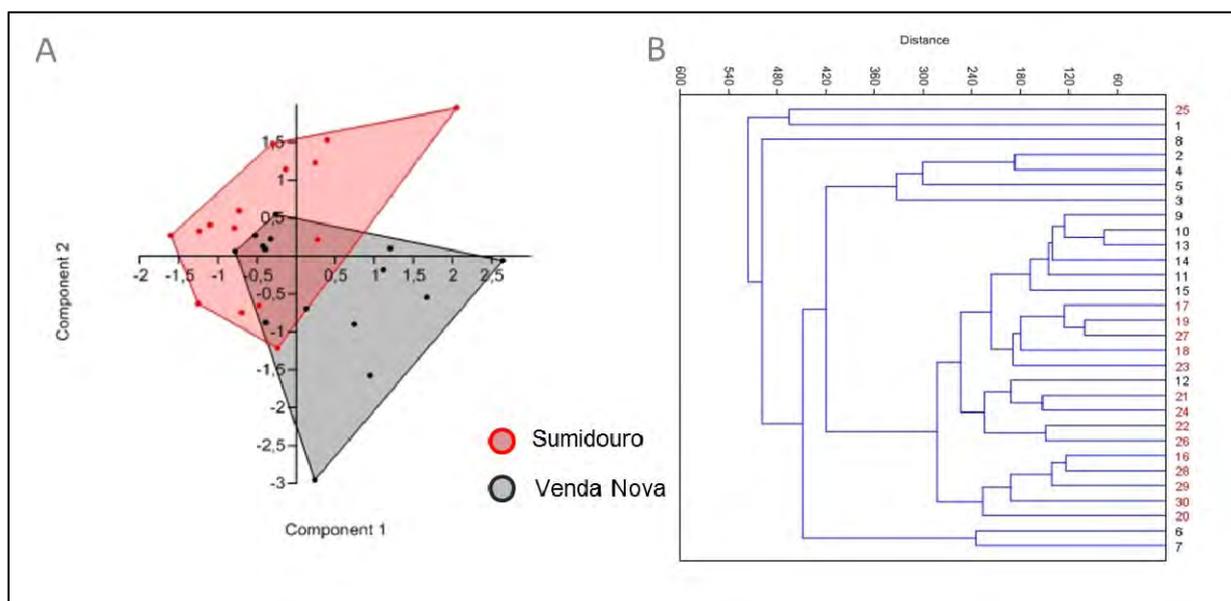
FONTE: elaborado pelo autor

FIGURA 12 - A: Espaço de ordenação da Análise de Componentes Principais (PCA) construída com os caracteres morfológicos das fêmeas. B: Dendrograma de similaridade dos caracteres morfológicos para as 30 fêmeas estudadas - Venda Nova (números destacados em preto) e Sumidouro (números destacados em vermelho). A medida de similaridade utilizada foi a de distâncias euclidianas e o algoritmo de grupos pareados.



FONTE: elaborado pelo autor

FIGURA 13 - A: Espaço de ordenação da Análise de Componentes Principais (PCA) construída com os caracteres morfológicos das 30 machos estudados. B: Dendrograma de similaridade dos caracteres morfológicos para as 30 machos estudados - Venda Nova (números destacados em preto) e Sumidouro (números destacados em vermelho). A medida de similaridade utilizada foi a de distâncias euclidianas e o algoritmo de grupos pareados.



FONTE: elaborado pelo autor

A comparação dos feromônios sexuais das populações do DS Venda Nova e do PE Sumidouro foi realizada com apenas 12 espécimes machos provenientes da área urbana e quatro da área silvestre. Ainda com esta pequena amostra o resultado corrobora o padrão de similaridade morfológica das populações. Em todos os espécimes foi identificado apenas o composto 9-metil-germacreno (quadro 9).

QUADRO 9 - Feromônios sexuais identificados de espécimes machos provenientes do Distrito Sanitário Venda Nova e do Parque Estadual do Sumidouro

Distrito Sanitário Venda Nova			Parque Estadual do Sumidouro		
Localidade	Espécimes de <i>Lu. longipalpis</i>	Composto identificado	Localidade	Espécimes de <i>Lu. longipalpis</i>	Composto identificado
VNSA	8	9-metil-germacreno-B	Entorno da gruta	3	9-metil-germacreno-B
VNSM	2	9-metil-germacreno-B	Entorno da gruta	1	9-metil-germacreno-B
VNCO	1	9-metil-germacreno-B			
VNVN	1	9-metil-germacreno-B			

FONTE: elaborado pelo autor

4.5 Ações de controle da Leishmaniose Visceral no DS no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013

As ações de controle da leishmaniose visceral realizadas no DS Venda Nova, bem como em todo o município de Belo Horizonte, seguem as metodologias preconizadas pelo Ministério da Saúde. O serviço de controle de zoonoses atua tanto no controle da população do reservatório canino, como no controle das populações de vetores. São realizados inquéritos caninos censitários, onde se busca realizar a sorologia da totalidade da população de cães de uma determinada área de abrangência e núcleos de borrifação que na média apresentam cerca de 500 a 2000 imóveis. Os indicadores utilizados para se elencar as áreas que serão trabalhadas são a ocorrência de casos humanos de LV e a positividade canina para *Leishmania* (PBH 2015, Brasil 2006).

Durante os anos avaliados o percentual total de imóveis borrifados no DS foi de 13,79% em 2011, 14,84% em 2012 e 9,50% em 2013. O percentual de borrifação por área de abrangência variou de 0,43 a 45,52 % em 2011; de 0,17% a 41,54% em 2012 e de 2,70% a 43,29% em 2013. Em todos os anos a maioria das áreas apresentou baixos percentuais de cobertura, a média esteve sempre em torno de 17,00% de imóveis borrifados nas áreas de abrangência (tabela 11).

No entanto, algumas áreas apresentam percentuais de imóveis borrifados muito baixos, como, por exemplo: 0,43% dos imóveis da área VNCO no ano de 2011, esse percentual corresponde a apenas 26 imóveis borrifados durante o ano. Outro exemplo é a área VNJE onde apenas 12 imóveis (0,17%) foram borrifados no ano de 2012 (tabela 11). Para se inferir sobre a qualidade do processo de borrifação e de processamento dos dados foram quantificados os percentuais considerando o tipo de ambiente borrifado: intradomiciliar (I), peridomiciliar (P) e intra e peridomiciliar (IP). Avaliou-se ainda a presença ou não do registro do ambiente borrifado. Os percentuais de ausência de registro (AR) foram 11,01% em 2011; 13,27% em 2012 e 20,76% em 2013. Nestas situações a ação de borrifação é realizada, mas em alguma etapa do fluxo de trabalho o registro da atividade não é realizado ou é perdido. Esta perda pode ocorrer durante a atividade de campo, quando o agente não realiza o registro ou durante o processo de digitação dos boletins no sistema, quando o digitador não realiza a correta digitação das informações (Tabela 20).

Quando o registro é feito é possível avaliar se o procedimento de borrifação é realizado em toda a extensão do imóvel. No DS Venda Nova o percentual de imóveis borrifados de forma completa foi de 75,55% em 2011, 72,60% em 2012 e 67,09% em 2013. Em todos os anos avaliados houve um pequeno número de imóveis que foram borrifados apenas na porção intradomiciliar (tabela 11).

Quanto à distribuição sazonal do quantitativo de imóveis borrifados, nos três anos avaliados, o maior registro da atividade de borrifação ocorreu nos meses de maio a agosto no ano de 2011 e 2012, e junho a setembro no ano de 2013. Dessa forma a atividade de borrifação não ocorreu em concordância com a curva sazonal de *Lu. longipalpis*, estratégia de controle preconizada pelo Ministério da Saúde (gráfico 4).

TABELA 11 - Número total de imóveis borrifado por área de abrangência e por tipo de borrifação realizada no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013

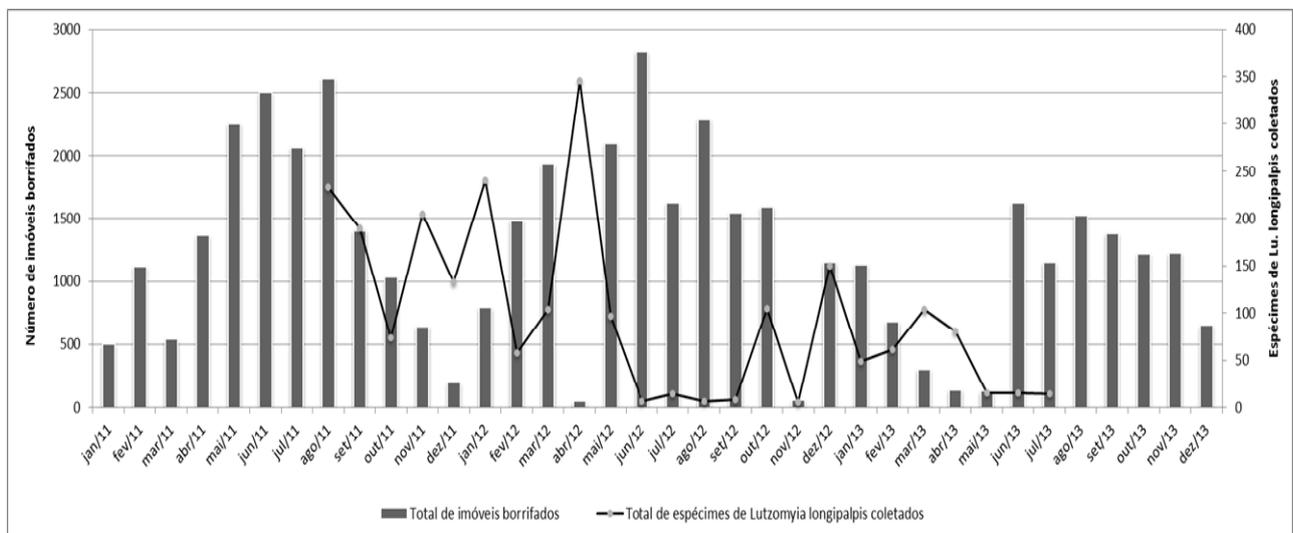
Anos avaliados	2011						2012						2013					
	Unidades borrifadas por área, tipo de unindade e total																	
Áreas de abrangência	I	P	IP	AE	Total	% em relação ao total da área	I	P	IP	AR	Total	% em relação ao total da área	I	P	IP	AR	Total	% em relação ao total da área
	9200	7	389	2252	234	2882	32.50	1	170	1045	161	1377	15.53		136	1137	289	1562
9210		9	86	6	101	1.43		1	9	2	12	0.17		198	1215	482	1895	26.82
9220	3	590	1983	351	2927	45.52	1	480	1579	407	2467	38.37						
9230							1	365	2346	271	2983	41.54	9	150	698	199	1056	14.71
9240	2	282	1922	204	2410	31.26	6	215	847	176	1244	16.13						
9250	6	312	1763	315	2396	35.06	1	205	1074	327	1607	23.51						
9260		80	532	135	747	6.14	3	120	510	80	713	5.86						
9270	4	29	247	69	349	6.31												
9280	4	144	1644	221	2013	22.08	2	35	113	17	167	1.83		391	1390	302	2083	22.85
9290		10	77	4	91	0.95		321	2184	294	2799	29.24						
9300								31	110	18	159	1.86	4	174	644	204	1026	12.02
9340	1	218	1200	147	1566	24.78	1	196	1193	198	1588	25.13	4	59	196	142	401	6.35
9350		7	71	18	96	1.76		4	112	31	147	2.70	1	215	1649	492	2357	43.29
9380		4	19	3	26	0.43	3	237	1176	214	1630	32.19						
9390		78	451	77	606	10.85	1	63	362	118	544	8.92		5	117	43	165	2.70
9410														10	447	166	623	11.15
Total	27	2152	12247	1784	16210	13.79	20	2443	12660	2314	17437	14.84	18	1338	7493	2319	11168	9.50
Porcentagem total	0.17	13.28	75.55	11.01	100		0.11	14.01	72.60	13.27	100.00		0.16	11.98	67.09	20.76	100.00	

I: Intradomiciliar; P: Peridomiciliar; IP: Intra e Peridomiciliar; AR: Ausência de Registro

FONTE: elaborado pelo autor

O gráfico 4 mostra a variação mensal do número de imóveis borrifados e a curva sazonal de *Lu. longipalpis* no DS de Venda Nova. A análise de correlação de quantitativo de imóveis borrifados e abundância mensal de *Lu. longipalpis* foi realizada considerando tanto a regional como um todo, quanto fazendo a análise individual de cada uma das áreas de abrangência e a respectiva curva sazonal. Para esta análise foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman que não exige que os dados provenham de distribuição normal. Em nenhum dos pareamentos foi encontrada correlação significativa entre as variáveis: curva sazonal de *Lu. longipalpis* e quantitativo mensal de imóveis borrifados.

GRÁFICO 4 - Variação do número total de imóveis borrifados mensalmente, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013, e curva sazonal de *Lutzomyia longipalpis*, no período de agosto de 2011 a julho de 2013, no DS Venda Nova.



FONTE: elaborado pelo autor

A análise da cobertura dos inquéritos caninos baseou-se nas ações censitárias, que são organizadas considerando o histórico epidemiológico das áreas de abrangência (positividade canina e registro de casos humanos). As ações de demanda espontânea não foram consideradas uma vez que estas são ações desencadeadas por solicitações diretas dos munícipes, sem relação com o histórico epidemiológico. Além disso, os exames por demanda espontânea, em sua grande maioria, são solicitados quando os cães já apresentam sinais clínicos aparentes aos tutores/proprietários. Nos anos de 2011 e 2012 o inquérito censitário atingiu a cobertura de 77,45% e 85,53% do total de cães do DS sanitário respectivamente. Já no ano de 2013 houve uma queda brusca da cobertura para apenas 38,73% da população canina. É importante salientar que isto ocorreu devido a troca,

realizada pelo Ministério da Saúde, do par de exames utilizados para a realização do diagnóstico sorológico canino em todo o território brasileiro. No ano de 2011 todas as coberturas por área de abrangência estiveram acima de 57,00%. E em três áreas a cobertura ultrapassou o número de cães previsto no censo canino. No ano de 2012 todas as áreas apresentaram cobertura acima de 64% e em quatro áreas o quantitativo ultrapassou o valor previsto no censo canino (tabela 12).

O ano de 2013 teve padrão atípico e a atividade de inquérito censitário foi realizada em apenas 12 das áreas de abrangência. Além disso, algumas áreas apresentaram coberturas de inquérito muito baixas e apenas duas áreas tiveram coberturas acima do quantitativo previsto pelo censo canino.

A positividade das amostras caninas entre as áreas de abrangência variou de 2.02 a 7.30% no ano de 2011 com um valor médio de 3.85%. No ano de 2012 esta variação entre as áreas de abrangência foi de 0.80 a 4.14%, com um valor médio de 2.48%. E em 2013 a variação foi de 1.52 a 5.88% com um valor médio de 2.63%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao se comparar as médias de positivities anuais das áreas de abrangência (p-valor: 0.6668). Ao se comparar a variação da positividade por área de abrangência entre os anos analisados percebe-se uma tendência de queda da positividade por área entre o ano de 2011 e os anos de 2012 e 2013. No ano de 2011 as positivities apresentaram uma maior amplitude de valores. Nos anos de 2012 e 2013 os valores foram mais homogêneos (tabela 12, gráfico 5).

Ao se analisar o padrão de variação mensal da positividade anual ao longo dos anos observa-se que, no geral, não é possível identificar um padrão de variação que apresente períodos com ocorrências diferenciadas nos valores de positividade. Em geral a variação apresentada nos valores é pequena. Novamente, o ano de 2011 apresentou valores mais elevados de positividade em relação aos anos de 2012 e 2013. Ao longo do período existe uma tendência de declínio dos valores da positividade canina (tabela 12, gráfico 5). Ao se comparar as médias de positividade canina mensais entre os anos, percebe-se que o ano de 2011 apresenta positividade mais elevada em relação a 2012 e 2013, entre os quais não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

A avaliação da existência de correlação estatística entre as variáveis: abundância de *Lu. longipalpis*, quantitativo de imóveis borrifados e soropositividade canina não foi realizada, pois estes eventos apesar de relacionados na cadeia epidemiológica da

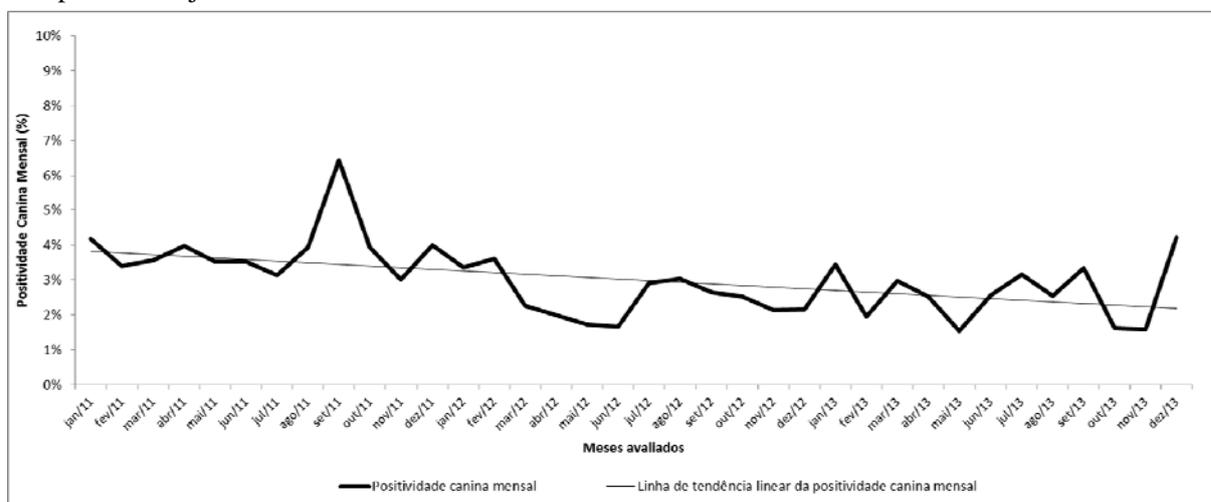
leishmaniose visceral são temporalmente separados. Qualquer tentativa de análise deveria considerar o tempo de incubação do parasito no organismo canino. Isto porque considerando a história natural da infecção após a picada infectante existe um período para que a infecção se estabeleça e possa ser detectada nos testes sorológicos. Portanto, a soropositividade canina em um determinado momento indica que em um período de tempo anterior ocorreu a transmissão do parasito para os animais.

TABELA 12 - Positividade canina em inquéritos censitários por área de abrangência no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013

Áreas	2011			2012			2013		
	Nº de Exames	Positividade (%)	Cobertura (%)	Nº de Exames	Positividade (%)	Cobertura (%)	Nº de Exames	Positividade (%)	Cobertura (%)
VNCA	2361	4.57	80.94	3533	3.00	121.12	831	2.77	28.49
VNJE	1774	2.99	69.82	1629	3.38	64.11	1781	2.81	70.09
VN JL	1438	2.71	78.37	1388	2.16	75.64	1237	2.59	67.41
VNLA	1556	3.28	105.28	1669	3.06	112.92	1555	1.54	105.21
VNMA	1884	3.82	73.80	1764	1.81	69.10	1041	3.46	40.78
VNMC	1979	2.02	75.85	1985	1.96	76.08	1894	3.33	72.59
VNSM	1982	4.89	63.83	1998	0.80	64.35	-	-	-
VNSV	736	2.58	113.93	1163	2.49	180.03	830	3.73	128.48
VNVN	1757	4.72	69.86	3995	2.78	158.85	17	5.88	0.68
VNRB	1944	7.30	69.55	1881	2.02	67.30	-	-	-
VNAN	1281	2.26	64.40	1373	2.55	69.03	1378	1.52	69.28
VNPI	2447	3.80	124.72	1439	2.50	73.34	17	5.88	0.87
VNNY	1229	2.77	74.76	1255	4.14	76.34	1338	2.77	81.39
VNCO	993	3.32	67.19	963	1.97	65.16	-	-	-
VNJA	1516	4.16	92.27	1411	2.06	85.88	-	-	-
VNSA	937	3.87	57.88	1060	2.83	65.47	989	2.02	61.09
Totais	25814	3.85	77.45	28506	2.48	85.53	12908	2.63	38.73

FONTE: elaborado pelo autor

GRÁFICO 5 - Variação mensal da positividade canina em inquéritos censitários no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013



FONTE: elaborado pelo autor

A análise do histórico dos cães sororregantes nos três anos avaliados demonstra que a eutanásia canina alcança porcentagens elevadas no DS Venda Nova (tabela 13). Nos três anos avaliados, a porcentagem de eutanásia realizada pelo centro de controle de zoonoses da PBH de cães de provenientes do DS foi acima de 77%. Ao se considerar as eutanásias particulares e as realizadas pelo serviço publico cerca de 80% dos cães sororreagentes foram eutanasiados por ano.

Do quantitativo de animais que não é submetido à eutanásia um percentual muito reduzido deve-se à recusa dos proprietários em entregar os animais (2011: 1,18%, 2012: 6,07%, 2013: 2,10%) e todos os anos cerca de 5% dos animais morrem antes de o recolhimento pelo serviço de saúde ser realizado. O quantitativo de cães não eutanasiados não possui um componente principal, cada um dos quatorze tipos de registro possíveis contribui de forma pouco expressiva (tabela 13).

TABELA 13 - Registro do histórico dos cães sororreagentes no DS Venda Nova no período de 2011 a 2013

Histórico dos cães sororreagentes em inquéritos censitários	2011		2012		2013	
	Quantitativo	%	Quantitativo	%	Quantitativo	%
Cão Fugiu	8	0.80	8	1.13	4	1.20
Contra Prova	3	0.30	6	0.85		
Em Tratamento	13	1.31	14	1.98	23	6.89
Encaminhado para Vigilância Sanitária	28	2.82				
Encerrado em outra amostra	5	0.50	2	0.28	3	0.90
Fechado	15	1.51	1	0.14	4	1.20
Morto	46	4.63	40	5.65	20	5.99
Mudou-se	10	1.01	10	1.41	8	2.40
Nova coleta de indeterminado	3	0.30	1	0.14		
Recusa Segundo Exame Particular	18	1.81	43	6.07	7	2.10
Negativo	4	0.40	5	0.71		
Vacina (Leishmune)	3	0.30	2	0.28		
Sem registro	11	1.11	7	0.99		
Cadela amamentando ou prenha					1	0.30
<u>Eutanásia no CCZ</u>	<u>794</u>	<u>79.88</u>	<u>562</u>	<u>79.38</u>	<u>259</u>	<u>77.54</u>
<u>Eutanásia Particular</u>	<u>33</u>	<u>3.32</u>	<u>7</u>	<u>0.99</u>	<u>5</u>	<u>1.50</u>
Total	994	100.00	708	100.00	334	100.00

A ocorrência de casos humanos de VL apresentou uma queda acentuada nos anos avaliados. No ano de 2011 foram registrados 16 casos em 12 áreas de abrangência do DS, sendo a taxa de letalidade de 25%. No ano de 2012 foram notificados cinco casos em três áreas de abrangência, com uma taxa de letalidade de 40%. No ano de 2013 apenas um caso foi registrado e não foram registrados óbitos. Apenas nas áreas de abrangência VNLA e VNMA foram registrados casos em mais de um ano, sendo que apenas na área VNLA houve registro de casos em todos os anos avaliados (tabela 14).

Na área VNSM onde foi registrada a maior abundância relativa de *Lu. longipalpis* e espécimes com detecção positiva para DNA de *Leishmania*, foi notificado um caso humano em 2011. Na área VNMA, com a segunda maior taxa de abundância relativa, registrou-se a ocorrência de dois casos, em 2011 e 2012. Entretanto, a área VNLA com registro de casos em todos os três anos, apresentou abundância muito baixa de *Lu. longipalpis*.

Nas áreas VNJE e VNMC que apresentaram abundâncias de *Lu. longipalpis* relativamente elevadas, em pelo menos um dos anos de estudo, e o registro de espécimes positivas para DNA de *Leishmania*, não foram registrados casos humanos no período.

TABELA 14 - Casos humanos de LV e óbitos por LV no DS Venda Nova no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013

Áreas de abrangência	Anos analisados					
	2011		2012		2013	
	Casos LVH	Óbitos	Casos LVH	Óbitos	Casos LVH	Óbitos
VNCA	-	-	-	-	-	-
VNJE	-	-	-	-	-	-
VNJL	1	-	-	-	-	-
VNLA	1	-	2	-	1	-
VNMA	2	-	-	-	-	-
VNMC	1	1	-	-	-	-
VNSM	1	-	-	-	-	-
VNSV	1	-	-	-	-	-
VNVN	2	1	-	-	-	-
VNRB	1	-	-	-	-	-
VNAN	-	-	2	1	-	-
VNPI	-	-	-	-	-	-
VNNY	1	-	-	-	-	-
VNCO	3	-	-	-	-	-
VNJA	1	1	-	-	-	-
VNSA	1	1	1	1	-	-
Total	16	4 (25%)	5	2 (40%)	1	-

5 Discussão

Fauna de flebotomíneos em áreas do bioma Cerrado com diferentes formas de ocupação antrópica

O objetivo mais amplo deste estudo foi realizar o monitoramento da fauna flebotomínica por dois anos consecutivos em duas áreas com características ambientais distintas. O monitoramento foi realizado utilizando-se abordagens diferentes em cada uma das áreas estudadas:

- i) no DS Venda Nova a abordagem foi acompanhar a variação sazonal dos flebotomíneos durante a execução das ações de controle da LV e
- ii) no PE Sumidouro o enfoque foi monitorar a fauna flebotomínica na principal trilha de atividade turística do parque.

Devido as diferentes abordagens e metodologias empregadas as análises ecológicas e estatísticas que pressupõem esforços amostrais semelhantes não puderam ser utilizadas. No entanto, a análise descritiva foi capaz de avaliar de maneira eficiente os padrões de ocorrência de fauna nas localidades estudadas.

O DS Venda Nova localiza-se na porção mais ao norte do município de Belo Horizonte e é caracterizado por uma realidade ambiental onde áreas de urbanização consolidada convivem com áreas de vilas e aglomerados urbanos e áreas com características marcadamente rurais.

Neste estudo a simples caracterização ambiental realizada dos locais de coleta de insetos demonstra que a complexidade do ambiente urbano pode gerar ambientes que favorecem a ocorrência de determinadas espécies de flebotomíneos sinantrópicas envolvidas nos ciclos de transmissão de espécies de *Leishmania* que podem causar agravos que representam importantes riscos para a saúde humana.

Dos 18 locais de coleta no DS Venda Nova foi observado que em quatorze havia criação de cães, em três a presença de outros animais como bovinos, equinos e suínos e em oito a presença de galinheiros. É conhecido que o manejo inadequado da criação de galinhas

pode favorecer a ocorrência de animais que representam risco a espécie humana como flebotomíneos e roedores (Brasil Ministério da Saúde 2007; Brasil Ministério da Saúde 2006; Alexander et al. 2002; Lainson & Rangel 2005; Curi et al. 2014; Coura-Vital et al. 2013; Caiaffa et al. 2008). Alguns estudos sobre a pesquisa de sítios de criação de flebotomíneos têm apontado os galinheiros como os locais preferenciais de ocorrência das larvas em áreas urbanas e peri urbanas (Casanova et al. 2013).

A criação de determinados animais, como suínos, bovinos e equinos, em área urbana não está proibida pelo código sanitário do município de Belo Horizonte, no entanto, tais espécies criadas de forma inadequada favorecem a ocorrência de um ambiente insalubre podendo contribuir para a ocorrência de agravos típicos do ambiente urbano. No código sanitário do município está previsto que os cidadãos responsáveis por imóveis devem impedir condições que favoreçam a ocorrência de animais sinantropicos e condições ambientais que representem risco para a coletividade (PBH 1996). Nos três locais em que havia a criação de animais de grande porte como suínos, bovinos e equinos havia acúmulo de fezes e a condição de criação era inadequada. O acúmulo de matéria orgânica no solo é sabidamente um dos fatores que propiciam a formação de ambiente favorável para a ocorrência de flebotomíneos, portanto a reorganização e limpeza do ambiente peridoméstico podem diminuir o risco de transmissão de *Leishmania* (Teodoro et al. 1995; de Souza et al. 2014). O cão doméstico é reconhecido como o principal reservatório urbano de *Leishmania infantum* no Brasil e seu papel como reservatório de *Le. brazileinsis* precisa ser esclarecido (Gontijo & Melo 2004; Marzochi & Marzochi 1994; Dantas-Torres et al. 2012). Dos dezoito locais de coleta, quatorze apresentavam a presença destes animais.

Vários autores postulam a necessidade de estudos pormenorizados e de técnicas mais específicas de diagnóstico para uma melhor avaliação do papel dos cães nos ciclos de transmissão de *Leishmania*, especialmente ao se considerar áreas de ocorrência simpátrica de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* (Dantas-Torres 2007; Coura-Vital et al. 2014; Gomes et al. 2007).

Apenas dois dos locais de coleta não apresentavam a presença de vegetação. Dos locais com presença de vegetação muitos apresentavam crescimento exacerbado de gramíneas e vegetação sem manejo adequado. Especialmente para a ocorrência de flebotomíneos, a presença de vegetação, matéria orgânica em decomposição e locais sombreados são fatores favorecedores. Sete dos locais de coleta apresentavam coleções

hídricas próximas e estas são associadas a fonte de umidade que favorece a presença destes insetos vetores. A importância das características ambientais dos focos de transmissão das leishmanioses é abordada em diversos trabalhos (Neto et al. 2009; Caiaffa et al. 2008; Teodoro et al. 1995; Teodoro et al. 2004). Há autores que postulam a necessidade de se incorporar a caracterização e o manejo ambiental nas medidas de controle das leishmanioses (WHO 2010; Teodoro et al. 1995; PBH 2014; Teodoro et al 2003).

No DS Venda Nova foram coletados 2.427 espécimes distribuídos em oito espécies, sendo que destes espécimes 95,3% pertenciam à espécie *Lu. longipalpis*. Esta espécie foi coletada em 15 das 16 localidades de estudo na área urbana sendo a de maior abundância em todas elas. Os dados apresentados corroboram outros estudos que demonstram que a espécie *Lu. longipalpis* apresenta grande adaptabilidade ao ambiente antropicamente modificado e que tende a ser espécie abundante nas áreas urbanas onde ocorre (Margonari et al. 2006; de Oliveira et al. 2003; Resende et al. 2006). Estes achados reforçam o fato da urbanização ser considerada um fator de risco para a ocorrência dos ciclos de transmissão da *Le. infantum* em áreas do cerrado brasileiro, principalmente quando esta ocorre de forma desordenada e sem se levar em conta as características ambientais resultantes do processo (Cattand et al. 2006; Desjeux 2001b).

No PE do Sumidouro foram coletados 4.675 espécimes, distribuídos em 25 espécies. A espécie *Lu. longipalpis* correspondeu a apenas 5,35% dos espécimes coletados. Apesar de ter sido coletada em todos os ambientes de estudo a espécie apresentou maior abundância na entrada da caverna, que é reconhecido como ambiente de menor variação de fatores ambientais como temperatura e umidade e que fornece abrigo e fontes de alimentação para os flebotomíneos (Carvalho et al. 2012).

As maiores taxas de riqueza, diversidade e abundância encontradas na área do parque quando comparadas com as taxas observadas na área urbana são explicadas pela análise descritiva simples. Mas o uso de dois índices não paramétricos, que não são influenciados de maneira preponderante pelos esforços amostrais também sumarizaram de forma satisfatória os resultados (Magurran 2004). Como os esforços amostrais das áreas foram distintos foi necessário optar por estratégias de análise diferenciadas.

Vale ressaltar que este é um tópico de discussão para as análises de comparação de riqueza e abundância de espécies em comunidades uma vez que a maioria dos índices apresentam sérios problemas conceituais e estatísticos e ainda não se conseguiu formatar um

método que responda de forma satisfatória mesmo as questões simples (Barrantes & Sandoval 2009). A análise conjunta dos dados apresentados nas tabelas 1, 2, 7, 8, 12 e 13 demonstra que nesse caso os índices descrevem de forma adequadamente a situação encontrada.

Em todas as amostragens a área do PE do Sumidouro apresentou valores mais elevados de diversidade e estes se mantêm relativamente estáveis durante o período de estudo, o que não é observado na área urbana. No PE do Sumidouro a equitabilidade entre as espécies é elevada, não havendo uma única espécie que corresponda a mais de 40% do total de flebotomíneos coletados na área.

Estes dados corroboram os encontrados em outros estudos onde áreas silvestres tendem a apresentar uma maior riqueza e diversidade. Em estudo realizado em Ilha Grande, RJ, Brasil, área recente de transmissão de *Le. infantum*, os autores encontraram maiores taxas de riqueza e abundância em áreas com menor modificação antrópica (Carvalho et al. 2013). Pinto et al. 2012 descrevem padrão semelhante em áreas de floresta tropical no estado do Espírito Santo, Brasil e destacam que as áreas conservadas apresentam maiores possibilidades de abrigo e fonte alimentar para os flebotomíneos. Estes dados vão ao encontro das clássicas teorias ecológicas que postulam que a maior plasticidade de habitats favorece a biodiversidade de espécies (Begon 2007).

Ao analisarmos as demais espécies coletadas em ambos os ambientes foi observado que o PE do Sumidouro registrou grande número de espécies que são vetoras suspeitas ou comprovadas de *Le. braziliensis*. No DS Venda Nova foram registrados espécimes pertencentes à espécie *Ny. whitmani* importante vetora de *Le. braziliensis* (Rangel & Lainson 2009). Entretanto, estudos realizados em Minas Gerais indicaram a presença de DNA de *Le. infantum* em *Ny. whitmani* (Margonari et al. 2010; Saraiva et al. 2010). Esta espécie apresentou baixa abundância na área urbana, com apenas 0,37% do total de espécimes. Apesar de apresentar tendência a adaptação em áreas antropizadas, sendo registrada com frequência em ambientes urbanos, *Ny. whitmani* apresenta maiores abundâncias em áreas verdes e ambientes silvestres (Carvalho et al. 2010; Nascimento et al. 2013). No PE do Sumidouro *Ny. whitmani* correspondeu a 1,56% dos espécimes coletados com registro em todos os ambientes e apresentando menor taxa de abundância no ambiente peridomiciliar.

Espécimes pertencentes às espécies *Ev. sallesi* e *Ev. cortelezii*, bem como ao complexo *Cortelezii* também foram registrados em baixa abundância no DS Venda Nova correspondendo a menos de 3% do total de flebotomíneos coletados. Estas espécies são consideradas suspeitas de participarem dos ciclos de transmissão de *Leishmania* sp. em algumas localidades. Elas são frequentemente coletadas em ambiente peridomiciliar e em ambas foi detectado o DNA de *Le. infantum* em estudos realizados no estado de Minas Gerais (Carvalho et al. 2010; Saraiva et al. 2009; Nascimento et al. 2013). Exemplares do complexo *Cortelezii* coletados no município de Belo Horizonte apresentaram positividade para DNA de *Le. braziliensis* (Saraiva et al. 2010). No PE do Sumidouro estas espécies corresponderam a 8,0% do total coletado e as maiores abundâncias foram registradas no ambiente peridomiciliar.

A espécie *Ev. lenti* apresentou baixa abundância em tanto no DS Venda Nova como no PES. Apesar do relato de que *Ev. lenti* seria refratária à infecção por *Leishmania* spp. (Brazil et al. 1997) o encontro de DNA de *Le. braziliensis* (Margonari et al. 2010) bem como de formas ativas de tripanossomatídeos no intestino da mesma (Sherlock 1996) foi observado.

No DS Venda Nova foi coletado apenas um exemplar de cada uma das espécies *Sc. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Mi. schreiberi* (Martins, Falcão & Silva, 1975) e *Lu. cavernicola* (Costa Lima, 1932). Estes registros surpreenderam pois são espécies que apresentam comportamento silvestre e não são comumente registradas em áreas urbanas (Pinheiro et al. 2013; Kent et al. 2013). Poder-se ia suspeitar de contaminação de armadilhas, no entanto as armadilhas utilizadas eram novas e sempre colocadas nos mesmos pontos de coleta. Interessantemente, as espécies *Mi. schreiberi* e *Lu. cavernicola* não foram registradas no PE do Sumidouro que seria um ambiente mais propício para a ocorrência das mesmas, no entanto, *Sc. sordelli* correspondeu a 1,60% do total de espécimes coletados no PE do Sumidouro e apresentou suas maiores taxas de abundância no ambiente de entrada e entorno da caverna, ambiente ao qual a espécie é relacionada. Em levantamento de fauna flebotomínica realizado em caverna do complexo espeleológico do Bambuí (Lassance/Minas Gerais) houve o registro da infecção de *Sc. sordelli* por tripanossomatídeos (Carvalho et al. 2013). *Lutzomyia cavernicola* é uma espécie frequentemente associada ao ambiente de caverna, mas também é registrada em outros ecótopos como áreas de matas e pastagens (Barata et al. 2008; Rego et al. 2014). Não há indícios de que esta espécie participe dos

ciclos de transmissão de *Leishmania*. *Micropygomyia schreiberi* também não apresenta indícios de participação no ciclo de transmissão das leishmanioses e apesar de ter sido registrada na região da gruta da Lapinha não foi registrada no PE Sumidouro et al. 1998). O exemplar coletado no DS Venda Nova foi registrado em ambiente de curral, comportamento que condiz com outros achados sobre a espécie (Souza et al. 2009).

As espécies *Ny. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Ny. neivai* (Pinto, 1926), *Mi. migonei*, *Pi. pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940) e *Pi. fischeri* são incriminadas de participação nos ciclos de transmissão de *Le. braziliensis* no Sudeste do Brasil (Foratini 1973; Ryan & Brazil 1984; Rangel et al. 1984; Andrade Filho et al. 2007) e neste estudo foram registradas apenas no PE do Sumidouro.

Nyssomyia intermedia é considerada importante vetora de *Le. braziliensis* em diversas localidades brasileiras em áreas urbanas e silvestres (Rêgo et al. 2015; Rangel & Lainson 2009). Em Belo Horizonte esta espécie já foi registrada, inclusive apresentando positividade para DNA de *Leishmania infatum* (Saraiva et al. 2010) o que suscita a necessidade de maiores estudos sobre a participação desta espécie no ciclo da LV no sudeste brasileiro. Em estudo realizado por (Souza et al. 2004), a espécie foi registrada no DS Venda Nova em baixíssima abundância (0,98%). No PE do Sumidouro *Ny. intermedia* foi registrada em todos os ambientes de estudo, mas apresentou maiores abundâncias na entrada da caverna e no entorno. Estes dados indicam a necessidade de vigilância epidemiológica e entomológica, dado o papel vetorial da espécie em áreas silvestres e seu registro em áreas de transmissão de *Le. braziliensis* próximas ao PE do Sumidouro (Margonari et al. 2006; Carvalho et al. 2010).

Migonemyia migonei foi coletada em cinco dos seis ambientes amostrados no PE do Sumidouro, e é uma espécie que ocorre frequentemente em áreas endêmicas para a infecção por *Le. braziliensis*. Vários estudos já registraram o encontro de DNA de *Leishmania* em espécimes fêmeos desta espécie (Aguiar et al. 2014; Teodoro et al. 1993).

As espécies *Pi. pessoai* e *Pi. fischeri* também podem estar envolvidas na transmissão de *Le. braziliensis* (Rangel & Lainson 2009). Neste estudo estas espécies apresentaram padrão de ocorrência completamente distinto. *Pi. pessoai* apresentou elevada abundância relativa, foi coletada em todos os ambientes estudados no PES, mas com predomínio marcante no ambiente de cerrado com vegetação decídua (cerrado 1). *Pintomyia fischeri* apresentou baixa abundância relativa e não foi registrada nos ambientes de peridomicílio e

entrada da caverna. Ambas as espécies são frequentemente registradas em localidades endêmicas para LT (Teodoro et al. 1993; Carvalho et al. 2010; Aguiar et al. 2014).

Pintomyia monticola (Costa Lima, 1932) foi coletada em reduzida abundância e com maior ocorrência nas áreas de cerrado, no entanto a elevada antropofilia e a detecção de DNA de *Le. braziliensis* em espécimes da mesma, apontam sua possível importância em ciclos de transmissão (Andrade & Gurgel-Gonçalves, 2015; Margonari et al., 2010).

O encontro de espécies potenciais e comprovadamente vetoradas de *Leishmania* e a situação epidemiológica dos municípios do entorno do PE do Sumidouro deixa clara a necessidade de um programa de vigilância entomológica, uma vez que áreas silvestres podem se tornar importantes focos de ocorrência de LT. A importância da atenção com esta situação está fundamentada em observações descritas por (Souza et al. 2014) sobre a região do entorno do Parque do Rio do Doce, Minas Gerais que foi diagnosticada como importante área de risco de transmissão de *Le. braziliensis*.

As demais espécies registradas no PE do Sumidouro não são suspeitas de participação no ciclo de transmissão de *Leishmania*. A análise da tabela 2 demonstra que a diversidade ambiental do PE do sumidouro comporta composições faunísticas muito diferenciadas mesmo em ambientes amostrais próximos.

As espécies do gênero *Brumptomyia* [(*Brumptomyia brumpt* (Larrousse, 1920) e *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932)] não foram registradas no ambiente peridomiciliar, e apresentaram abundâncias relativas mais elevadas no ambiente de cerrado (Cerrado 1 e 2). Este padrão de ocorrência condiz com outros levantamentos faunísticos (Nascimento et al. 2013; Saraiva et al. 2006; Perez et al. 2014).

Padrão semelhante de distribuição pode ser observado para as espécies:, *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia barretoii barretoii* (Mangabeira, 1942), e *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932). As espécies *Pintomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Pintomyia mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias & Brazil, 1994) e *Ps. lutziana* também apresentaram padrão semelhante, mas um pequeno número de espécimes foi registrado no ambiente peridomiciliar.

As espécies com maiores taxas de abundância total apresentaram distribuição completamente diferenciada. *Micropygomyia quinquefer* foi a espécie com maior abundância relativa (37,54%) no PE do Sumidouro. E apesar de ter sido registrada em todos os ambientes de estudo, apresentou elevada abundância no ambiente de vegetação rupícola

com 71,68% dos espécimes coletados neste ecótopo. Já a espécie *Lu. renei*, que correspondeu a 22,67% dos espécimes coletados, apresentou elevada abundância no ambiente de entrada da caverna com 96,32% dos espécimes coletados neste ecótopo.

Estes dados demonstram que a estrutura ecológica do PE Sumidouro é complexa e diversa. As áreas de mata (Cerrado 1 e 2) apresentam elevadas taxas de riqueza e taxas de abundância menos elevadas. As áreas de ambiente rupícola apresentam menores taxas de riqueza e taxas de abundância mais elevadas e são habitats que favorecem de forma significativa a ocorrência de algumas espécies. Vale ressaltar que no ambiente peridomiciliar foram registradas quase todas as espécies vetoras coletadas no estudo o que pode indicar um risco maior de transmissão neste ambiente.

Apesar de os flebotomíneos não serem tradicionalmente analisados para estudos de conservação ecológica nossos dados apontam e reforçam os trabalhos que levantam a necessidade de melhores estratégias de proteção do bioma cerrado (WWF 2014). Dada a complexidade ecológica do PE Sumidouro ao se considerar sua fauna flebotomínica, pode-se inferir que este fenômeno também ocorra para outros grupos de invertebrados ainda não estudados na região.

Os achados relacionados à fauna de flebotomíneos no PE do Sumidouro estão de acordo com as descrições do bioma: a diversidade de ambientes do cerrado forma um complexo conjunto de mosaicos de habitats e de fisionomias vegetais, o que contribui para a distribuição não uniforme das espécies (Brasil Ministério do Meio Ambiente 2014).

A perda de biodiversidade na fauna flebotomínica com o processo de urbanização fica evidente ao se analisar a composição faunística do DS Venda Nova, onde todos os locais de estudo apresentam composição faunística muito semelhante e sempre com o predomínio da espécie *Lu. longipalpis*. Como postulado por Cattand et al 2006 estes dados associados a alta prevalência de casos humanos no DS Venda Nova demonstram que as alterações antrópicas podem favorecer os ciclos de ocorrência da LV, principalmente se esta modificação é um processo de urbanização realizado de forma desorganizada, como ocorre no DS Venda Nova.

As curvas de variação sazonal também demonstram os contrastes observados em relação à biodiversidade nas duas áreas estudadas. No DS Venda Nova o padrão da curva é delineado por *Lu. longipalpis*, já no PE do Sumidouro o padrão é delineado por várias espécies. No PE do sumidouro as espécies *My. quinquerfer* e *Lu. renei* são as responsáveis

pelos maiores picos de ocorrência, mas o padrão de ocorrência destas é diferente. *My. quinquerfer* apresentou maiores abundâncias nos períodos quentes e chuvosos e em muitas vezes não foi registrada nos meses secos e frios. *Lutzomyia renei* também apresentou maiores abundâncias nos períodos quentes e chuvosos, mas manteve taxas consideráveis de abundância em praticamente todos os meses de estudo.

É interessante relatar que as curvas de ambas as áreas apresentam os maiores picos de registro de flebotomíneos nos meses quentes e chuvosos e as menores taxas de registro nos meses secos e frios. Este padrão está de acordo com outros estudos realizados tanto no município de Belo Horizonte como na região da Gruta Lapinha (PES) (Andrade Filho et al. 1998; Saraiva et al. 2011), mas, no entanto difere de outros estudos realizados em Belo Horizonte nos quais os picos de registros de flebotomíneos nos meses quentes e chuvosos não são tão evidentes (Souza et al. 2004).

Estes resultados demonstram que o monitoramento entomológico é necessário para que as medidas de prevenção e controle das leishmanioses baseadas nas estratégias de controle vetorial sejam realizadas de forma adequada. Uma vez que os padrões de variação sazonal estão sujeitos a mudanças ligadas aos fatores ambientais e ao padrão da composição das comunidades de insetos.

Os mapas de distribuição de vetores em ambas as áreas resumem a situação de risco epidemiológico. Em ambas as áreas há uma importante densidade vetorial. Como registrado em outros estudos o risco não é igualmente distribuído entre os pontos, havendo maior registro de espécies vetorais, ou potencialmente vetorais, em locais com determinadas características ambientais (Saraiva et al. 2012; Margonari et al. 2006; Belo et al. 2013). A localidade VNSM no DS Venda Nova e os ambientes de vegetação de cerrado e vegetação de cerrado decídua, bem como os ambientes rupícola e de entrada da caverna no PE Sumidouro apresentaram elevada densidade vetorial.

No DS Venda Nova os dados de densidade vetorial podem ser diretamente relacionados ao risco de transmissão de *Leishmania infantum*, uma vez que a região apresenta elevado número de casos humanos e elevada porcentagem de cães sorologicamente positivos. Como descrito por (Rushton 2003) a saúde pública agora possui ferramentas para analisar pontos-chaves nas relações dos eventos envolvidos nos agravos humanos e o estimador de Kernel tem sido utilizado em várias abordagens de análises em saúde (Brasil Ministério da Saúde 2007).

No PE Sumidouro os dados apontam para a necessidade de vigilância, pois pode haver estabelecimento de ciclos que envolvam os parasitos dada a importante presença dos vetores e a proximidade da região com importantes áreas endêmicas. Dado o potencial turístico da região do PE do Sumidouro com a tendência de aumento do número de visitantes os dados apresentados são de relevância para o estabelecimento de vigilância entomológica na área. Este tipo de situação tem sido descrita em outras áreas de turismo no Brasil (Carvalho et al. 2013; Barata et al. 2008).

A curva de saturação das espécies coletadas em ambas as áreas de estudo apresentou estabilização antes da vigésima amostragem. Este dado indica que a metodologia amostral descreveu de forma satisfatória os padrões de riqueza em ambas as áreas. Infelizmente, este parâmetro raramente é considerado nos estudos de descrição de fauna de flebotomíneos realizados no Brasil (Pinto et al. 2012; Pinheiro et al. 2013; de Oliveira et al. 2013). Entretanto, estudos com outros grupos de animais demonstram que a estabilização da curva de espécies precisa ser interpretada considerando-se o esforço amostral bem como a riqueza e equitabilidade de espécies nas áreas (Aguiar & Gaglianone 2008).

O PE Sumidouro, apesar do menor esforço amostral e da maior riqueza de espécies apresentou uma estabilização mais precoce (16^o amostragem) o que pode ser explicado pelas elevadas taxas de equitabilidade da área. Já o DS Venda Nova apresentou uma estabilização mais tardia (19^o amostragem) apesar do maior esforço amostral e da menor riqueza. No entanto a área urbana apresentou valores de equitabilidade muito baixos que explicam o comportamento da curva de acúmulo de espécies.

A grande diferença encontrada nos resultados de riqueza, diversidade e abundância de espécies entre o DS Venda Nova e o PE do Sumidouro demonstra que a maneira como a espécie humana modifica o meio ambiente e interage com o mesmo pode determinar uma maior exposição das populações humanas aos flebotomíneos e por consequência ao risco de adquirir a infecção por *Leishmania* (Cattand et al. 2006).

Nossos dados demonstram de forma irrefutável que as modificações antrópicas que ocorreram na área de cerrado estudada, alteraram de forma significativa as populações de flebotomíneos. Tais mudanças podem ser vistas nas taxas de riqueza, diversidade e abundância e também é notório que as relações entre os organismos são modificadas no ambiente antropizado. Como postulado por (Gomes 2002) não é possível desconsiderar os

fatores antrópicos nas ações de controle das endemias e são necessárias melhorias nas ações de vigilância entomológica para efetivar ações de prevenção.

Detecção de DNA de tripanossomatídeos em fêmeas de flebotomíneos coletadas em áreas urbana e silvestre

As taxas de detecção de DNA de *Le. infatum* e *Le. braziliensis* em fêmeas de *Lu. longipalpis* no DS Venda Nova estão em concordância com o cenário epidemiológico do DS, onde há uma elevada taxa de cães sororreagentes e o registro constante de casos humanos de LV e LT. A possibilidade de *Lu. longipalpis* atuar como vetor de *Le. braziliensis* precisa ser investigada em outros estudos. É importante ressaltar que *Lu. longipalpis* é uma espécie permissiva ao desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania* em infecções experimentais (Gontijo et al. 1995; Da Silva et al. 1990; Walters et al. 1993).

Apenas uma fêmea pertencente ao Complexo cortelezzi foi positiva para a detecção de DNA de *Le. braziliensis* no PE Sumidouro. Mesmo representando uma taxa de infecção natural de apenas 0,62% dos espécimes coletados no parque, este dado aponta para a circulação do parasito na área e reforça a necessidade de programas de vigilância entomológica e epidemiológica.

É interessante frisar que o alvo molecular utilizado - fragmento da região intergênica do ITS-1 - foi descrito como alvo específico para o gênero *Leishmania* (Dweik et al. 2007). Entretanto, observamos que a utilização deste alvo foi capaz de detectar na PCR e identificar no sequenciamento outro gênero da família Tripanosomatidae. Em duas amostras de fêmeas provenientes do PE Sumidouro foi identificado o DNA de *Chritidia*. Alguns estudos mostram a grande similaridade entre os membros da família tripanosomatidae e a que vários grupos desta família podem interagir com os flebotomíneos. Assim é necessário extremo critério e avaliação em estudo de detecção de DNA de *leishmania*, uma vez que podem ocorrer identificações cruzadas entre gêneros e espécies (McCarthy et al. 2011; Ferreira et al. 2014).

A diversidade nas populações de *Lutzomyia longipalpis*

A espécie *Lu. longipalpis* é a principal vetora de *Le. infantum* no Brasil. Desde a década de 1960 vários estudos apontam diferenças morfológicas entre as populações desta espécie, e mais recentemente há estudos que afirmam tratar-se de um complexo de espécies com variações morfológicas, genéticas e comportamentais (Mangabeira 1969; Ward 1988; Lanzaro et al. 1993; Bauzer et al. 2002a; Bauzer et al. 2002b; Bottecchia et al. 2004).

Tal questionamento pauta-se em outros estudos nos quais populações alopátricas de *Lu. longipalpis* provenientes de Natal, RN, Gruta da Lapinha, MG e Jacobina, BA foram consideradas geneticamente diferenciadas e com pequeno fluxo gênico entre elas (Bauzer et al. 2002a). Estudo realizado com populações simpátricas originárias de Sobral, CE também observou diferenciação genética, morfológica e comportamental em *Lu. longipalpis* (Bauzer et al. 2002b; Araki et al. 2009; Bauzer et al. 2007).

Os dados encontrados em nosso estudo incrementam a discussão sobre a existência de populações geneticamente diferentes de *Lu. longipalpis* influenciando seu comportamento nos ambientes distintos. Entretanto, existe a possibilidade de se tratar apenas da enorme adaptabilidade da espécie ao ambiente antropicamente modificado.

A disparidade de resultados para *Lu. longipalpis* nas duas áreas de estudo reforça a necessidade de se aprofundar os estudos sobre esta espécie. O padrão de ocorrência de *Lu. longipalpis* no PE do Sumidouro difere dos padrões encontrados para a espécie, pois ela foi coletada em maior número nos habitats menos antropizados e apenas um exemplar foi coletado no ambiente peridomiciliar das residências localizadas no entorno do parque. No DS Venda Nova a espécie apresentou padrão de comportamento típico de dominância e abundância. Em estudos anteriores, que descrevem a fauna flebotomínica de Belo Horizonte, a espécie *Lu. longipalpis* apresentou elevada abundância e alta taxa de infecção natural (Saraiva et al. 2011; Resende et al. 2006; Souza et al. 2004).

Os dados de comparação morfométrica e de composição de feromônios sexuais das populações de *Lu. longipalpis* do DS Venda Nova e do Parque Estadual do Sumidouro indicam grande similaridade entre as populações. Apesar das pequenas diferenças encontradas para as medidas de alguns caracteres, as diferenças morfométricas não são capazes de diferenciar as populações em grupos distintos. Este dado aliado à mesma composição de feromônios sexuais das duas populações indica que, neste caso, pode tratar-se de um exemplo da grande adaptabilidade da espécie *Lu. longipalpis*, ou de uma das subpopulações do complexo *Lu. longipalpis*, ao ambiente antropicamente modificado.

A comparação genética das populações do DS Venda Nova e do PE Sumidouro tornam-se importantes perspectivas de prosseguimento deste trabalho para buscar elucidar esta questão. Em estudo realizado com populações provenientes do Mato Grosso do Sul, Santos et al. 2013 e Santos et al. 2015 estudaram cinco populações provenientes das localidades: Aquidauana, Bonito, Campo Grande, Três Lagoas e Miranda. Na análise morfométrica os autores relatam que as populações provenientes das quatro primeiras localidades formam um grupo distinto da população de Miranda. No entanto, a análise por marcadores microssatélites não foi capaz de diferenciar estas populações.

A composição de feromônios encontrada para as populações de *Lu. longipalpis* do Parque Estadual do Sumidouro e do DS Venda Nova é a mesma que já foi relatada para as populações desta espécie provenientes da gruta da Lapinha (Hamilton et al. 2005).

A análise da composição de feromônios sexuais embasou-se inicialmente em diferentes morfológicas nas glândulas que os produzem. Em Sobral, Ceará, são conhecidas duas populações simpátricas de *Lu. longipalpis* que apresentam tanto diferenças morfológicas como no tipo de feromônio produzido (Ward et al.1989; Maingon et al. 2003). No estado de São Paulo populações que produzem 9-metil-germacreno-B e cembreno 1 apresentam distribuição geográfica distinta (Casanova et al. 2015).

Ações de controle da Leishmaniose Visceral no Distrito Sanitário Venda Nova

Nos últimos duzentos anos, a população humana residente nas cidades aumentou de 5% para 50%. As estimativas para 2030 são de mais de dois terços da população mundial morando em centros urbanos. Tal mudança trouxe consigo várias alterações no estilo e condições de vida das populações como reflexo do desenvolvimento industrial e tecnológico exponencial que parecem ser as maiores razões para o crescimento dos centros urbanos. Considerando o histórico humano no planeta o processo de urbanização é extremamente recente e a compreensão dos efeitos do mesmo na ocorrência de agravos à saúde humana ainda constitui um grande desafio em saúde pública. Esta perspectiva torna-se ainda mais dramática ao considerarmos os processos de urbanização que ocorrem em países subdesenvolvidos e de clima tropical (Lau et al. 2010; Neto et al. 2009).

A atual importância epidemiológica da LV em grandes centros urbanos brasileiros ilustra bem este desafio. Apesar do grande número de estudos sobre os diversos aspectos do

agravo e de estratégias de controle classicamente estabelecidas a infecção humana e canina permanecem como um sério problema (Brasil Ministério da Saúde 2006; Ferreira et al. 2014; Coura-Vital et al. 2013; Harhay et al. 2011; Oliveira et al. 2008).

Além disso, a avaliação dos impactos das medidas de controle nos cenários epidemiológicos em que o agravo ocorre é extremamente difícil. Diversos fatores podem influenciar na qualidade das ações de controle e não há procedimentos padronizados para que a qualidade destas ações seja avaliada (Fiúza et al. 2008; Filho & Silva 2012).

Um dos objetivos iniciais deste estudo foi realizar o monitoramento da fauna de flebotomíneos no Distrito Sanitário Venda Nova e a influencia das ações de controle da leishmaniose visceral sobre a mesma. No DS a curva de saturação das espécies estabilizou antes da oitava coleta, este fato indica que a metodologia de amostragem descreveu de forma satisfatória a riqueza de espécies da área. Entretanto, as análises de correlação entre a curva sazonal e as ações de borrifação de inseticidas não foram suficientemente informativas neste estudo.

O estudo da fauna flebotomínica foi planejado de forma a contemplar todas as áreas de abrangência para que se tivesse uma visão geral no DS de Venda Nova durante as ações de controle. A ausência de correlação entre a atividade de borrifação e a o padrão de variação da fauna pode indicar a necessidade de metodologias mais pontuais de avaliação das atividades de borrifação. O levantamento global da fauna, com a utilização de apenas uma armadilha por área de abrangência, não foi suficiente para a descrição de um padrão de correlação entre as variáveis. Mas obteve-se uma descrição das populações de flebotomíneos em seus aspectos gerais e sua curva de variação sazonal. Como descrito por diversos autores o uso de inseticidas de forma inadequada pode determinar a ineficácia de medidas de controle das leishmanioses (Alexander & Maroli 2003; WHO 2010; Filho & Silva 2012). Nas análises que realizamos foi observado que os períodos de maior abundância de *Lu. longipalpis* não foram coincidentes com aqueles onde as atividades de borrifação foram intensificadas. Esta conduta está em desacordo com o que é preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil Ministério da Saúde 2006), no entanto, ao se pensar em uma medida de controle, cujo objetivo principal é a redução da população de vetores, o controle da população de flebotomíneos em um período em que a mesma já se encontra naturalmente reduzida pode representar uma boa estratégia (Andrade Filho – comunicação pessoal).

Em estudo realizado no Distrito Sanitário Noroeste, em Belo Horizonte, os autores sugerem que o elevado número de recusas ao processo de borrifação pelos munícipes em determinada área de abrangência pode estar relacionado a uma maior incidência de casos humanos de LV. No entanto, os mesmos autores relatam que casos de LVH também foram registrados em áreas com elevado nível de aceitação do processo de borrifação. Estes autores também sugerem que a variabilidade no período de incubação da infecção é um dos fatores que podem explicar, influenciar e dificultar este tipo de análise (Filho & Silva 2012; de Araújo et al. 2013)

O registro de imóveis borrifados apenas na área peridomiciliar é uma questão importante e que deve ser considerada, pois pode impactar na qualidade do processo de borrifação. Em Belo Horizonte é conhecido que os flebotomíneos são coletados também no interior das residências e as ações restritas ao ambiente peridomiciliar podem influenciar no controle dos vetores (Souza et al. 2004).

A ocorrência de atividade de borrifação apenas nas áreas peridomiciliares dos imóveis pode ocorrer devido a recusa munícipes da execução do serviço no interior das residências. A realização da atividade de borrifação intradomiciliar necessita da preparação da residência e esta é de responsabilidade dos moradores. No entanto, a borrifação apenas peridomiciliar pode representar um risco para os moradores, uma vez que o interior da casa não receberá os agentes químicos que possuem ações de repelência e letalidade para os insetos (Filho & Silva 2012).

É necessário avaliar novas estratégias para a priorização das áreas de abrangência que serão borrifadas com inseticidas. Considerando que o período de incubação da LVH é variável e que a definição do local de ocorrência de transmissão do parasito é muito difícil o uso da incidência de casos humanos como indicador pode ser inadequado uma vez que o mesmo não possui caráter preditivo. No DS Venda Nova a homogeneidade das taxas de cães sororeagentes para *Leishmania* entre as áreas de abrangência faz com que este também não seja considerado um bom indicador para a priorização de áreas para ações de borrifação.

Há uma grande disparidade de opiniões sobre a leishmaniose visceral canina em medicina veterinária e na há concordância científica sobre as estratégias de manejo dos cães enquanto reservatórios de *Leishmania infantum chagasi* (Solano-Gallego et al. 2009). No entanto a eutanásia de cães sororeagentes para *Leishmania* é uma das estratégias norteadoras do controle da LV e preconizada pelo Ministério da Saúde. No DS Venda Nova esta é a

medida realizada de forma mais eficaz. Uma elevada porcentagem da população canina é submetida a testes sorológicos para *Leishmania* e um alto número dos cães sororreagentes é submetido à eutanásia. Este foi o padrão encontrado nos anos de 2011 e 2012, a exceção foi o ano de 2013, pois houve troca dos testes diagnósticos e falta de kits para realização dos mesmos (PBH 2014).

Nos anos de 2011 e 2012 em todas as áreas de abrangência do DS Venda Nova mais de 50% da população canina foi submetida ao diagnóstico sorológico e nos três anos analisados mais de 80% dos cães sororreagentes foram submetidos à eutanásia. A tendência de declínio das taxas de cães sororreagentes pode ser um indicador do sucesso das medidas de controle da LVC, no entanto avaliações mais robustas são necessárias para que se possa realizar inferências a este respeito. É importante salientar que o diagnóstico sorológico recomendado pelo ministério da saúde e realizado pelos municípios não identifica a espécie de parasito presente nas infecções caninas (Brasil Ministério da Saúde 2006; Gomes et al. 2007). A ocorrência da infecção de cães por *Le. braziliensis* já foi registrada em Belo Horizonte, em estudo onde técnicas diagnósticas de rotina foram comparadas a métodos moleculares (Quaresma et al. 2009). Estudo realizado também em Belo Horizonte em dois períodos distintos mostrou que no primeiro período a maioria dos cães estava infectada por *Le. infantum* e que no segundo momento mais de 80% albergavam a *Le. braziliensis* (Ferreira et al. 2015). Entretanto, a taxa de infecção canina por *Le. braziliensis* no DS Venda Nova não é conhecida.

A tendência de queda na taxa de cães sororreagentes para *Leishmania* pode ser um indicador de sucesso das medidas de controle, entretanto, são necessários estudos com avaliações mais robustas para que este tipo de conclusão seja considerado no momento da avaliação e planejamento das estratégias de controle.

As áreas de abrangência que apresentaram maiores taxas de abundância de coleta de flebotomíneos foram as que tiveram fêmeas com detecção positiva para o DNA de *Leishmania*. No entanto, os dados de distribuição espacial de flebotomíneos vetores e os dados de taxas de positividade canina por área de abrangência apontam para uma circulação ativa dos parasitos em toda a extensão dos DS Venda Nova. Assim, pode se supor que o maior número de fêmeas testadas para a detecção de DNA de *Leishmania* nas áreas com abundâncias mais elevadas favoreceu a detecção de *Leishmania*, mas não necessariamente implica em maiores taxas de infecção nestas áreas.

O acentuado decréscimo no número de casos humanos de LV no DS Venda Nova precisa ser avaliado em uma série histórica mais longa sendo difícil correlacionar este fato às ações de controle do agravo no período estudado. A presença de *Lu. longipalpis* em todas as áreas de abrangência, bem como a detecção de DNA tanto de *Le. infantum* como de *Le. braziliensis* em fêmeas desta espécie, apesar da diminuição no número de casos humanos e da tendência de queda da positividade canina, indicam a necessidade de manutenção e melhoria das ações de vigilância epidemiológica e entomológica.

A homogeneidade dos indicadores casos humanos e positividade canina para *Leishmania* destaca a necessidade de novas abordagens para se elencar as áreas que serão submetidas às medidas de controle que já são utilizadas e para a introdução do manejo ambiental como estratégia de rotina.

As medidas de controle da Leishmaniose Visceral preconizadas pelo Ministério da Saúde não tem resultado na contenção da disseminação da infecção humana e canina no Brasil (Harhay et al. 2011). A remoção dos cães sororeagentes e a borrifação de inseticidas sem a implementação de medidas de saneamento ambiental das localidades não previne a infecção em novos cães, bem como a ocorrência de casos humanos. Como apontado por (Coura-Vital et al. 2013) a presença de um cão previamente infectado em uma residência é fator de risco para que um novo animal também adquira a infecção. Estes dados reforçam a necessidade de implementação de mediada de manejo ambiental.

6 Conclusões

- A composição da fauna de flebotomíneos foi marcadamente diferente no DS Venda Nova e no Parque Estadual do Sumidouro, os menores índices de diversidade, abundância e equitabilidade encontrados no DS Venda Nova são compatíveis com o padrão de urbanização e consequente degradação da variedade de habitats para os flebotomíneos. Os padrões de diversidade de fauna flebotomínica encontrados no PES são compatíveis com a variedade de habitats da área silvestre amostrada;
- Tanto na área urbana como na silvestre a curva de flebotomíneos apresentou as maiores taxas de coleta de insetos nos meses quentes e chuvosos, padrão coincidente com outros estudos sobre a biologia e desenvolvimento deste grupo de insetos;
- As taxas de infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Le. infatum* e *Le. braziliensis* encontradas no DS Venda Nova são compatíveis com o cenário epidemiológico do DS e suscitam maiores estudos sobre os ciclos de transmissão de *Le. braziliensis*. A detecção de infecção natural de uma fêmea do complexo *cortelezzi* no PES está condizente com os dados epidemiológicos que demonstram a circulação do parasito na área e demonstram a necessidade de vigilância epidemiológica e entomológica;
- A análise das ações de controle da LV realizadas no DS Venda Nova apontou que são necessários estudos pormenorizados para que inferências mais robustas possam ser obtidas sobre a variação sazonal dos flebotomíneos e as medidas de controle realizadas;
- O monitoramento sistemático da fauna flebotomínica poderia ser integrado aos indicadores: positividade canina e ocorrência de casos humanos, para o direcionamento das ações de controle;

Referências

- AGUIAR, Gustavo M. et al., 2014. **Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro State, Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 56(2), pp.143–149. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626417>.
- ALEXANDER, Bruce et al., 2002. **Role of the Domestic Chicken (Gallus gallus) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil.** , 8(12).
- ALEXANDER, Bruce. & Maroli, Michele., 2003. **Control of phlebotomine sandflies.** Medical and Veterinary Entomology, 17, pp.1–18.
- ALVAR, Jorge et al., 2012. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PLoS One, 7(5), p.e35671. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>.
- ALVAR, Jorge et al., 2006. **Leishmaniasis and poverty.** Trends in parasitology, 22(12), pp.552–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023215> [Accessed February 4, 2015].
- ANDRADE FILHO, José Dilermando et al., 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, pp.481–487.
- ANDRADE FILHO, José Dilermando et al., 1998. **Sazonalidade dos flebotomíneos dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais.** Revista Brasileira de Entomologia, 42(3/4), pp.93–95.
- ANDRADE, Andrey José and Gurgel-Gonçalves, Rodrigo., 2015. **New record and update on the geographical distribution of Pintomyia monticola (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America.** Check List the journal of biodiversity data, 11(2), p.Article 1566.
- ARAKI, Alejandra.S. et al., 2009. **Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).** PLoS Negl Trop Dis, 3(1), p.e365. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172187>.
- DE ARAÚJO, Valdelaine Etelvina Miranda et al., 2013. **Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area.** PLoS neglected tropical diseases, 7(11), p.e2540. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2015].
- ASHFORD, Richard Ward., 1996. **Leishmaniasis reservoirs and their significance in control.** Clinics in Dermatology, 14(5), pp.523–532. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0738081X96000417>.
- BARATA Marta M. de L. and CONFALONIERI Ulisses E. C., 2011. **População do Estado do Rio de Janeiro: Os impactos das mudanças climáticas nas áreas social, saúde e ambiente.** Coordenação Geral Martha Macedo de Lima Barata – D . Sc . Coordenação Técnica POPULAÇÃO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO AOS IMPACTOS DAS MUDANÇAS CL, Rio de Janeiro.
- BARATA, Ricardo .A. et al., 2008. **Flebotomíneos do Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, MG.** Neotropical Entomology, 37, pp.226–228.

- BARRANTES, Gilbert and Sandoval, Luiseng., 2009. **Conceptual and statistical problems associated with the use of diversity indices in ecology**. *Rev Biol Trop*, 57(3), pp.451–460. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19928446>.
- BAUZER, Luiz. G. et al., 2007. **Lutzomyia longipalpis in Brazil: a complex or a single species? A mini-review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(1), pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293992>.
- BAUZER, Luiz. G., Gesto, J.S., et al., 2002a. **Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the Lutzomyia longipalpis complex**. *Mol Biol Evol*, 19(9), pp.1624–1627. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200489>.
- BAUZER, Luiz. G., Souza, N.A., et al., 2002b. **The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis**. *Insect Mol Biol*, 11(4), pp.315–323. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144696>.
- BAUZER, Luiz. G.S.R. et al., 2002c. **Letter to the Editor Molecular Divergence in the period Gene Between Two Putative Sympatric Species of the Lutzomyia longipalpis Complex**. , 1, pp.1624–1627.
- BEATTIE, Lynnete and Kaye, Paul.M., 2011. **Leishmania-host interactions: what has imaging taught us?** *Cellular microbiology*, 13(11), pp.1659–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819514> [Accessed January 29, 2015].
- BEGON Michael., 2007. **Ecology – From Individuals to Ecosystems**, 4th ed., Michael Begon, Colin R. Townsend, John L. Harper, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 738 pages, Price £37.50 (paperback) ISBN: 1405111178. *Biological Conservation*, 135, pp.309–309.
- BELO, Vinícius.S. et al., 2013. **Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis**. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), p.e2182. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638203>.
- BLACK, W.C., & Moore, C.G. 2005. **Population biology as a tool to study Vector borne diseases. Biology of Disease Vectors**, 2nd edn (ed. by W.C. Marquardt), pp. 187 – 206. Elsevier Press, Amsterdam, the Netherlands. In M. W.C., ed. *Population biology as a tool to study Vector borne diseases*. Elsevier Press, Amsterdam, the Netherlands, p. 2005.
- BOTTECHIA, M. et al., 2004. **Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis**. *J Mol Evol*, 58(6), pp.754–761. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15461432>.
- BRASIL Ministério da Saúde, 2006. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Available at: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf
- BRASIL Ministério da Saúde, 2007. **Introdução à Estatística Espacial para Saúde Pública**, Brasília - DF.
- BRASIL - 2013, Ministério da Saúde 2013. **Levantamento de rápido de índices para Aedes aegypti – Liraa -Para vigilância entomológica no Brasil**. Available at: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_liraa_2013.pdf
- BRASIL, 2014. **Ministério do Meio Ambiente - Brasil**, p.2014. Available at: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> .
- BRAZIL, Reginaldo P. et al., 1997. **Biology of Lutzomyia lenti (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae)**. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26, pp.191–19

- BRAZIL, Rreginaldo.P., Caballero, N.N. & Hamilton, J.G.C., 2009. **Identification of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Asunción, Paraguay.** *Parasites & vectors*, 2, p.51.
- CAIAFFA, Waleska.T. et al., 2008. **Saúde urbana: “a cidade é uma estranha senhora, que hoje sorri e amanhã te devora.”** *Ciência & Saúde Coletiva*, 13, pp.1785–1796.
- CALIGIURU, Lorena.G. et al., 2014. **Polymerase chain reaction-based assay for the detection and identification of sand fly gregarines in *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis.** *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 39, pp.83–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24820560>.
- CAMERON, M.M. et al., 1995. **Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil.** *Medical and veterinary entomology*, 9, pp.263–272.
- CARDIM, Marisa.F. et al., 2013. **Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011.** *Rev Saude Publica*, 47(4), pp.691–700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346660>.
- CARVALHO, Bruno.M. et al., 2013. **Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil.** *Parasites & vectors*, 6(1), p.325. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 22, 2014].
- CARVALHO FERREIRA, Aline.L. et al., 2014. **Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(4), pp.418–421. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485588>.
- CARVALHO, Gustavo M. et al., 2013. **Ecological aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambui, Brazil.** *PLoS One*, 8(10), p.e77158. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130847>.
- CARVALHO, Gustavo M. et al., 2012. **Hourly activity and natural infection of sandflies (Diptera: psychodidae) captured from the aphotic zone of a cave, minas gerais state, Brazil.** *PLoS One*, 7(12), p.e52254. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284957>.
- CARVALHO, Gustavo .M. et al., 2010. **Study of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Collected in a *Leishmania*-Endemic Area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Brazil.** *Journal of Medical Entomology*, 47(6), pp.972–976.
- CASANOVA, Carlos. et al., 2015. **Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo state, Brazil.** *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), p.e0003620. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4363371&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2015].
- CASANOVA, Carlos. et al., 2006. **Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, pp.113–115.
- CASANOVA, Carlos. et al., 2013. **Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7.

- CATTAND, P. et al., 2006. **Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis.** In D. T. Jamison et al., eds. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Washington (DC). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250331>.
- COLWELL, Douglas.D., Dantas-Torres, F. & Otranto, D., 2011. **Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives.** *Veterinary parasitology*, 182(1), pp.14–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852040> [Accessed August 7, 2015].
- CORREA ANTONIALLI, Suelly .A. et al., 2007. **Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil.** *The Journal of infection*, 54(5), pp.509–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979241> [Accessed August 22, 2014].
- COURA-VITAL, Wendel et al., 2013. **Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil.** *Veterinary Parasitology*, 197, pp.411–417.
- COURA-VITAL, Wendel. et al., 2014. **Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis.** *PloS one*, 9(3), p.e91009. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3946667&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2015].
- COURA-VITAL, Wendel et al., 2013. **Risk Factors for Seroconversion by Leishmania infantum in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil.** *PLoS ONE*, 8.
- COUTINHO, Leopoldo.M., 2006. **O conceito de bioma.** *Acta Botanica Brasilica*, 20, pp.13–23.
- CRUZ, Israe. et al., 2002. **A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1, pp.S185–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055836>.
- CURI, Nelson.H.D.A. et al., 2014. **Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic Forest fragments.** *PloS one*, 9(8), p.e104003. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4121198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2015].
- DANTAS-TORRES, Felipe., 2009. **Canine leishmaniosis in South America.** *Parasites & vectors*, 2 Suppl 1, p.S1.
- DANTAS-TORRES, FELIPE. et al., 2012. **Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences.** *Trends in parasitology*, 28(12), pp.531–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995719> [Accessed February 11, 2015].
- DANTAS-TORRES, F., 2007. **The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis.** *Vet Parasitol*, 149, pp.139–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703890>.
- DASZAK, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D., 2001. **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife.** In *Acta Tropica*. pp. 103–116.
- DESJEUX, Philippe., 2001a. **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), pp.239–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490989>.

- DESJEUX, Philippe., 2001b. **Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis**. Med Microbiol Immunol, 190(1-2), pp.77–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770116>.
- DIAS, Eedelberto.S. et al., 2011. **Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil**. Veterinary Parasitology, 176, pp.101–111.
- DOSTÁLOVÁ, Anna and Volf, Peter, 2012. **Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview**. Parasites & vectors, 5, p.276. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3533922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2014].
- DOUGHERTY Martin and & Hamilton, Gordon, 1997. **Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of Lutzomyia longipalpis**. Journal of Chemical Ecology, 23, pp.2657–2671. Available at: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?id=doi:10.1023/A:1022598523803>.
- DWEIK, A. et al., 2007. **Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of Leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material**. Ann Trop Med Parasitol, 101(5), pp.399–407. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550645>.
- FARIA, Angelica R. & Andrade, H.M. De, 2012. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 3(2), pp.47–57. Available at: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- FELICIANGELI, MariaD., 2004. **Natural breeding places of phlebotomine sandflies**. Medical and Veterinary Entomology, 18, pp.71–80.
- FERREIRA, Eduardo D.C. et al., 2015. **Mixed infection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in rodents from endemic urban area of the New World**. BMC veterinary research, 11, p.71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4374209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 7, 2015].
- FERREIRA, Leandro R. et al., 2014. **New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that Crithidia and Leptomonas have antigenic similarity to L. (L.) chagasi**. Acta Tropica, 131, pp.41–46.
- FILHO, F.S. et al., 2012. **Recusas de borrifação de imóveis e ocorrência de casos de leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte**. Arq. bras. med. vet. ..., 07, pp.899–908. Available at: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&expSearch=647691&indexSearch=ID>.
- FIÚZA Vanessa. O. P. et al., 2008. **Perspectivas para a produção de insumos estratégicos para vigilância e controle das leishmanioses. A situação e as necessidades de grandes centros urbanos no Brasil: o exemplo de Belo Horizonte**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(Suplemento III), pp.82–88.
- FORATINI, O.P., 1973. **Entomologia Médica**, São Paulo, E. Blücher/ EDUSP.
- FREITAS-LIDANI, Karita.C., et al., 2014. **A comparison of molecular markers to detect Lutzomyia longipalpis naturally infected with Leishmania (Leishmania) infantum**. Memórias do Instituto Oswaldo

Cruz, 109(4), pp.442–447. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000400442&lng=en&nrm=iso&tlng=en [Accessed August 10, 2015].

GIUNCHETTI, Rodolfo C. et al., 2006. **Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the Leishmania (Leishmania) chagasi Burden in Dermal Inflammatory Foci**. Journal of Comparative Pathology, 135, pp.100–107.

GOMES, Almério de C., 2002 **Vigilância Entomológica**. , Informe Epidemiológico do SUS 11(2), pp.79–90. Available at: <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/iesus/v11n2/v11n2a04.pdf>

GOMES, Almério de C. et al., 1998. **Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31(6), pp.553–558.

GOMES, Aparecida H.S. et al., 2007. **PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis**. Veterinary Parasitology, 144, pp.234–241.

GONTIJO, Célia M.F. et al., 1995. **The development of species of Leishmania Ross, 1903 in Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912)**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 90, pp.367–373.

GONTIJO, Célia M.F. and Melo, Maria N., 2004. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, 7, pp.338–349.

HARMARSHEH, O. et al., 2009. **Molecular markers for Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) and their usefulness for population genetic analysis**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 103, pp.1085–1086.

HAMILTON, J.G. et al., 2005. **Analysis of the sex pheromone extract of individual male Lutzomyia longipalpis sandflies from six regions in Brazil**. Med Vet Entomol, 19(4), pp.480–488. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336313>.

HAMILTON, J.G. et al., 2004. **A fourth chemotype of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil**. Journal of medical entomology, 41, pp.1021–1026.

HARHAY, M.O. et al., 2011. **Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil**. Trends in Parasitology, 27, pp.403–409.

HOOPER, a. M. et al., 2006. **Synthesis of 9-methylgermacrene B, racemate of the sex pheromone of Lutzomyia longipalpis (Lapinha), from the renewable resource, Geranium macrorrhizum essential oil**. Green Chemistry, 8(6), p.513. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b602875f> [Accessed January 8, 2015].

IBGE, 2015. No Title. **IBGE Cidades - Belo Horizonte**, p.310620. Available at: IBGE Cidades Belo Horizonte [Accessed July 13, 2015].

IEF, 2013. Instituto Estadual de Florestas – **Áreas Protegidas** , p.2013. Available at: <http://www.ief.mg.gov.br/areas- protegidas/>.

KAMHAWI, S., 2006. **Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?** Trends in parasitology, 22(9), pp.439–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843727> [Accessed February 1, 2015].

KENT, A.D. et al., 2013. **Studies on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in high-transmission areas of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Suriname**. Parasit Vectors, 6(1), p.318. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24499490>.

- LAINSON, Ralph. and RANGEL, Elisabeth F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100(8), pp.811–827. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444411>.
- LAINSON, Ralph. and SHAW, Jeffrey J., 1987. **Evolution, classification and geographical distribution.** In **The leishmaniasis in biology and medicine.** Volume I. Biology and epidemiology. p. 120.
- LANZARO, G.C. et al., 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg, 48(6), pp.839–847. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8333579>.
- LAU, C.L. et al., 2010. **Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire?** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 104, pp.631–638.
- LEHANE, M.J., 2005. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**, Cambridge University Press – Available at: <http://www.cambridge.org/br/academic/subjects/life-sciences/entomology/biology-blood-sucking-insects-2nd-edition?format=PB&isbn=9780521543958>
- MAGURRAN, A.E., 2004. **Measuring Biological Diversity.** African Journal of Aquatic Science, 29, pp.285–286.
- MAIA-ELKHOURY , A.N.S. & Sena, J.M. De, 2008. **Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges Leishmaniose visceral no Brasil : evolução e desafios.** , 24(12), pp.2941–2947.
- MAINGON, R.D.C. et al., 2003. **Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil.** Molecular Ecology, 12, pp.1879–1894. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294X.2003.01871.x>.
- MANGABEIRA, O., 1969. **Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará.** Rev Bras Malariol D Trop, 21, pp.3–25.
- MARGONARI, Carina. et al., 2006. **Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 101(1), pp.31–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699707>.
- MARGONARI, Carina. et al., 2010. **Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and Leishmania infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil.** J Med Entomol, 47(6), pp.1212–1219. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175074>.
- MAROLI, M. et al., 2013. **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.** Medical and Veterinary Entomology, 27, pp.123–147.
- MARZOCHI, M.C. and MARZOCHI, K.B., 1994. **Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control.** Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica, 10 Suppl 2, pp.359–375.
- MCCARTHY, C.B., Diambra, L.A. & Pomar, R. V., 2011. **Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 5.
- MORENO, E.C. et al., 2006. **Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39, pp.421–427.

- NASCIMENTO, B.W. et al., 2013. **Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in the central-western state of Minas Gerais, Brazil.** *Acta Trop*, 125(3), pp.262–268. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178219>.
- NETO, Jose Cerbino, et al., 2009. **Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis : an ecological study in Teresina , Piauí State , Brazil Fatores associados à incidência da leishmaniose visceral em área urbana : um estudo ecológico.** , 25(7), pp.1543–1551.
- OLIVEIRA, A.G. et al., 2003. **Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000.** *Cad Saude Publica*, 19(4), pp.933–944. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973559>.
- OLIVEIRA, C.D.L., et al., 2008. **Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, 24, pp.2953–2958.
- OLIVEIRA, E.F. et al., 2013. **Climatic factors and population density of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) in an urban endemic area of visceral leishmaniasis in midwest Brazil.** *J Vector Ecol*, 38(2), pp.224–228. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581349>.
- PATZ , J.A. et al., 2000. **Effects of environmental change on emerging parasitic diseases.** *International Journal for Parasitology*, 30, pp.1395–1405.
- PBH, 1996. **LEI No 7.031, DE 12 DE JANEIRO DE 1996.** Available at: www.cmbh.mg.gov.br/sites/default/.../codigo_sanitario_-_lei_7031.doc [Accessed December 29, 2014].
- PBH, 2014. **PBH. Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte**, p.12768. Available at: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&.
- PEREZ, J. et al., 2014. **Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(1), pp.80–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271002>.
- PEREZ, J.E. et al., 1994. **Natural Leishmania infection of Lutzomyia spp. in Peru.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, pp.161–164.
- PINHEIRO, M.P. et al., 2013. **Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil.** *J Vector Ecol*, 38(2), pp.307–316. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581360>.
- PINTO, I.S. et al., 2010. **Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil.** *J Vector Ecol*, 35(2), pp.325–332. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175939>.
- PINTO, I.S. et al., 2012. **Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil.** *J Vector Ecol*, 37(1), pp.90–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22548541>.
- PUGEDO, H. et al., 2005. **HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects.** *Rev Soc Bras Med Trop*, 38(1), pp.70–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717102>.

- QUARESMA, P.F. et al., 2009. **Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR.** *Acta Tropica*, 111, pp.289–294.
- RANGEL, E.F. et al., 1984. **Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of visceral leishmaniasis of Rio de Janeiro.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79(3), pp.395–396. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6535924>.
- RANGEL, E.F. and LAINSON, R., 2009. **Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.937–954. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027458>.
- REGO, F.D. et al., 2014. **Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriaba Indigenous Reserve, Brazil.** *Parasit Vectors*, 7, p.220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886717>.
- REGO, F.D. et al., 2015. **Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil.** *PloS one*, 10(4), p.e0122038. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4390197&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- RESENDE, M.C. De et al., 2006. **Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte , State of Minas Gerais** *Variação sazonal de *Lutzomyia longipalpis* em Belo Horizonte* . , 39(1), pp.51–55.
- RICARDO, A., Duarte, B. & Minas, P.U.C., 2002. **Histórico da urbanização de Belo Horizonte a partir da década de 70 : uma análise das políticas públicas ambientais e de urbanização do município.** , pp.21–31. Available at: http://alpha.unipam.edu.br/documents/18125/22863/historico_da_urbanizacao_de.pdf
- RIDDE, V., 2007. **Reducing social inequalities in health: public health, community health or health promotion?** *Promotion & Education*, 14, pp.63–67.
- ROGERS, M.B. et al., 2014. **Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population.** *PLoS genetics*, 10(1), p.e1004092. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3894156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ROSENTHAL, L.A. et al., 1996. ***Leishmania* major-human macrophage interactions: Cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion.** *Infection and Immunity*, 64, pp.2206–2215.
- ROUGERON , V. et al., 2010. **“Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses.** *PLoS pathogens*, 6(8), p.e1001004. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924324&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- RUSHTON , G., 2003. **Public health, GIS, and spatial analytic tools.** *Annu Rev Public Health*, 24, pp.43–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471269>.
- RYAN, L. and BRAZIL, R.P., 1984. ***Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) on the island of Sao Luis, Maranhao State, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79(3), pp.383–384. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6535920>.

- SANTOS, M.F. et al., 2013. **Genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, based on microsatellite markers.** PLoS One, 8(9), p.e74268. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066129>.
- SANTOS, M.F.C. et al., 2015. **Morphometric Analysis of Longipalpis (Diptera: Psychodidae) Complex Populations in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Journal of Medical Entomology, 52(3), pp.359–367. Available at: <http://jme.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jme/tjv006>.
- SARAIVA, L. et al., 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(1), pp.56–63.
- SARAIVA, L. et al., 2012a. **Information system and geographic information system tools in the data analyses of the control program for visceral leishmaniasis from 2006 to 2010 in the sanitary district of venda nova, belo horizonte, minas gerais, Brazil.** J Trop Med, 2012, p.254361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518168>.
- SARAIVA, L. et al., 2012b. **Information system and geographic information system tools in the data analyses of the control program for visceral leishmaniasis from 2006 to 2010 in the sanitary district of venda nova, belo horizonte, minas gerais, Brazil.** J Trop Med, 2012, p.254361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518168>.
- SARAIVA, L. et al., 2009. **Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil.** J Med Entomol, 46(5), pp.1159–1163. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19769049>.
- SARAIVA, L. et al., 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(2), pp.137–145.
- SARAIVA, L. et al., 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, 105(8), pp.1033–1039.
- SCARISBRICK, J.J. et al., 2006. **Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis.** Travel medicine and infectious disease, 4(1), pp.14–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887720> [Accessed January 26, 2015].
- SCHÖNIAN, G. et al., 2003. **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47(1), pp.349–358. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S07328893030009B32> [Accessed January 6, 2015].
- SENSKY, T., 2002. **The world's most neglected diseases.** , BMJ 325(July), pp.176–177.
- SHERLOCK, I.A., 1996. **Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 91(6), pp.671–683. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283643>.
- SINAN, 2014. **Sistema Nacional de Agravos de Notificação.** Available at: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>.
- DA SILVA, A.L. et al., 1990. **Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 85, pp.453–458.

- SILVA, E.S. et al., 2001. **Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96, pp.285–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313633>.
- SOARES, R.P.P. and TURCO, S.J., 2003. **Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 75, pp.301–330.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al., 2009. **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** Veterinary parasitology, 165(1-2), pp.1–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559536> [Accessed October 30, 2014].
- SOUZA, C.F et al., 2009. **Contribution to the knowledge of the phlebotomine sand flies fauna (Diptera: psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brazil.** Neotropical entomology, 38(2), pp.267–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19488518>.
- SOUZA, C.F. et al., 2014. **Phlebotomine fauna in the urban area of Timoteo, State of Minas Gerais, Brazil.** Acta Trop, 134, pp.72–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24613154>.
- SOUZA, C.M. De et al., 2004. **Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99(8), pp.795–803. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761593>.
- SOUZA, N. a et al., 2008. **Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis s.l. (Diptera: Psychodidae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103(2), pp.216–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425278>.
- EL TAI, N.O. et al., 2001. **Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing.** Experimental parasitology, 97(1), pp.35–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207112>.
- TAIL, N. El et al., 1996. **Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Volume 94, Issue 5, September–October 2000, Pages 575–579
- TEODORO, U. et al., 1993. **Phlebotomines in an area of transmission of tegumentar leishmaniasis in the northern region of Parana State, Brazil: seasonal variation and nocturnal activity.** Rev Saude Publica, 27(3), pp.190–194. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115833>.
- TEODORO, U. et al., 1995. **Environmental Sanitation and Peri-Domiciliar Organisation as Auxiliary Practices for the Control of Phlebotomines in Paraná State , Southern Brazil.**
- TEODORO et al. A., 2003. **Influência da reorganização , da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no Município de Doutor Camargo , Estado do Paraná , Brasil Influence of rearrangement and cleaning of the peridomicil. , 19(6), pp.1801–1813.**
- TEODORO, U. et al., 2004. **Reorganization and Cleanness of Peridomiciliar Area to Control Sand flies (Diptera , Psychodidae , Phlebotominae) in South Brazil. , 47(June), pp.205–212.**
- VIGODER, F.M. et al., 2010. **Lovesongs and period gene polymorphisms indicate Lutzomyia cruzi (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva, 1912) complex.** Infect Genet Evol, 10(6), pp.734–739. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478408>.

WALTERS, L.L. et al., 1993. **Life cycle of Leishmania major (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)**. Journal of medical entomology, 30, pp.699–718.

WANG, Z., Gerstein, M. and SNYDER, M., 2009. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics**. Nature reviews. Genetics, 10(1), pp.57–63.

WARD R D, et al 1989. **Bioassays as an Indicator of Pheromone Communication in Lutzomyia Longipalpis (Diptera : Psychodidae)** . , 171, p.1989.

WARD, R., 1988. **The Lutzomyia longipalpis complex: reproduction. and distribution**. In Oxford, pp. p. 225–269 and 407–417.

WHO. 2010. **Control of the leishmaniases.**, Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WWF, 2014. **WWF – Brasil 2014 – Cerrado** , p.2014. Available at: http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/cerrado/%3E.

YOUNG, D.G. and DUNCAN, M.A., 1994. **Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyiasand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America**. Journal of Biological Sciences, 14, pp.79–94. Available at: <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA285737>.

Anexos

Licença para coleta Parque Estadual do Sumidouro IEF-MG

IEF
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS

DIRETORIA DE BIODIVERSIDADE
GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS

LICENÇA PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISAS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Nº LICENÇA	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA UC	ENDEREÇO	CONTATO	ASSINATURA RESPONSÁVEL UC
UC: 072/11	Parque Estadual Sumidouro	Rogério Favares de Oliveira	Escritório Regional, Centro Norte, R. Frei de Andrade, 131 Centro - Barbacena - MG Cep: 35700-017	(31) 3774-8273 (31) 3774-8337 (31) 3774-8087	

Esta licença será válida apenas com a autorização do responsável pelo(s) Unidade(s) de Conservação

- **PERÍODO DE VALIDADE:** Setembro de 2011 a Setembro de 2012.
- **TÍTULO DO PROJETO:** Estudo Populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychoididae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro.
- **RESPONSÁVEL PELO PROJETO:** José Dilermano Andrade Filho.
- **DEMAIS INTEGRANTES:** Lara Saraiva, Célia Maria Ferrares Gontijo, Paula Cavalcante Lamy Serra e Meira, Mariana Campos das Neves Farah Ramos, Cynthia de Souza Leal, Gustavo Mayr de Lima Carvalho, Helbert Antônio Botelho e Juliana Xavier Faustino.
- **INSTITUIÇÃO:** Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz.
- **ENDEREÇO:** Rua Santa Cruz nº 892/201, Bairro: Barroca, Belo Horizonte/MG, Cep: 30.430-430.
- **CONTATO:** Tel: (31) 9871-0504 E-mail: jandrade@cpqrr.fiocruz.br

OBSERVAÇÕES: Autorização para coleta de Diptera em anexo.

- 1- Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Estadual, o pesquisador (titular deverá comparecer à administração desta unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
- 2- O Instituto Estadual de Florestas não se responsabiliza por quaisquer danos a equipamentos, acidentes ou lesões físicas ou psicológicas dentro da UC, incluindo ainda, o pesquisador responsável e sua equipe, devido a vulnerabilidade da área de realização da pesquisa.
- 3- Esta autorização não exonera o titular e a sua equipe de quaisquer danos a serem suportados por terceiros em decorrência de atos ilícitos praticados, bem como do consentimento do responsável pela área pública ou privada onde será realizado a atividade.
- 4- O projeto poderá ser cancelado pelo órgão, caso o executor não atenda as normas exigidas para controle das atividades.
- 5- Caso a Licença seja indeferida ou o projeto não seja aceito, ficar sem efeito em contato com a GPROF, o mais rápido possível.
- 6- Conforme o Termo de Compromisso o responsável pelo projeto deverá apresentar relatório final ao término da validade desta licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente licença.
- 7- Esta licença não autoriza comercial transporte de material biológico nas áreas de influência de empreendimentos sujeitos ao licenciamento ambiental, conforme resolução do CONAMA de nº 237 de 18/12/97, salvo quando especificado.
- 8- Esta licença não autoriza o uso de material biológico para obtenção de origem genética, com ou sem todo ou parte de espécie vegetal, fungos, micróbios ou animais, em substâncias provenientes do metabolismo de seres vivos e de extratos liofilizados destes organismos vivos ou mortos, encontrados nas condições in situ, inclusive domesticado, ou mantidos em coleções ex situ, desde que colhidos em condições in situ, no território nacional, no platelasma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificação de componentes de patrimônio genético e informação sobre conhecimentos tradicionais associados, com potencial de uso comercial de acordo com Medida Provisória nº 2.002 de 29 de junho de 2000 e Medida Provisória nº 2.185-10, de 23 de Agosto de 2001.
- 9- Válida exclusivamente no estado de Minas Gerais.
- 10- Esta licença não autoriza:
 - captura, coleta e transporte de espécies ameaçadas de extinção, salvo quando previsto de projeto específico aprovado;
 - captura, coleta e transporte de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso do titular do propriedade nos termos das art. 204, 208, 295, 337 e 338 do código civil;
 - captura, coleta e transporte de fauna e flora em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando autorizadas ou consentimento do órgão administrador competente;
- 11- Válido somente em atividades de pesquisa.

O pesquisador deverá estar sempre acompanhado deste documento, para apresentá-lo as autoridades.

<p>Data de Emissão:</p> <p style="text-align: center;">13/09/11</p>	<p>Assinatura do responsável pela Licença</p> <div style="text-align: center;"> <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">ROGERIO FAVARES DE OLIVEIRA</p> </div>
--	---

Cidade Administrativa Tancredo Neves, Edifício Minas - 1º andar - Meia: 01-168 e 01-495 -
 Rodovia Prefeito Américo Jacaré, s/n - Bairro: Serra Verde - Belo Horizonte - MG CEP: 31630-930
 Tel: (31) 39151327 E-mail: pesquisa.gpro@meioambiente.mg.gov.br

Licença permanente para coleta de material biológico- MMA – IBAMA - ICMBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-1	Data da Emissão: 28/03/2008 18:35
------------------------	--

Dados do titular

Registro no Ibama: 356074	Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exige o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Psychodidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42668519



Página 1/2

Licença permanente para coleta no Parque Estadual do Sumidouro- MMA – IBAMA – ICMBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30297-2	Data da Emissão: 17/09/2012 09:35	Data para Revalidação*: 17/10/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Título do Projeto: Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro Minas Gerais - Brasil	
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas de campo	08/2011	12/2013
2	Caracterização ambiental	08/2011	12/2013
3	Redação de artigos e relatórios	06/2012	12/2014
4	Análises ecológicas, morfométricas	06/2012	12/2014
5	Estudos de infecção natural e fonte alimentar	06/2012	12/2014
6	Estudos populacionais	06/2012	12/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Lara Saraiva	Aluna de Doutorado	014.266.286-09	MG11395158 SSP-MG-MG	Brasileira
2	Célia Maria Ferreira Gontijo	Coomadorea das Abordagens Moleculares	392.318.796-34	M663908 SSP-MG	Brasileira
3	Mariana Campos das Neves Farah Ramos	Bióloga	089.711.496-55	MG13404579 SSP-MG-MG	Brasileira
4	Juliana Xavier Faustino	Bióloga	096.431.466-50	10293529 SSP-MG-MG	Brasileira
5	Gustavo Mayr de Lima Carvalho	Biólogo	041.330.886-38	MG8612659 SSP-MG	Brasileira
6	Cynthia de Souza Leal	Bióloga	055.235.996-38	11391225 SSP-MG	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69243285



RESEARCH ARTICLE

Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Environmentally Protected Area in Brazil

Lara Saraiva^{*,*}, Alanna Silva Reis[‡], Jeronimo Marteleto Nunes Rugani[‡], Agnes Antônia Sampaio Pereira[‡], Felipe Dutra Rêgo[‡], Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima[‡], Célia Maria Ferreira Gontijo[¶], José Dilermando Andrade Filho[¶]

Grupo de Estudos em Leishmanioses—Centro de Pesquisas René Rachou—FIOCRUZ—MINAS—Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CP 1743, 30190–002 Belo Horizonte, MG, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* lara@cpqrr.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Saraiva L, Silva Reis A, Marteleto Nunes Rugani J, Sampaio Pereira AA, Rêgo FD, Vianna Mariano da Rocha Lima AC, et al. (2015) Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Environmentally Protected Area in Brazil. PLoS ONE 10(8): e0134845. doi:10.1371/journal.pone.0134845

Editor: Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, BRAZIL

Received: January 31, 2015

Accepted: July 15, 2015

Published: August 12, 2015

Copyright: © 2015 Saraiva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: We are indebted to the Conselho Nacional de Pesquisa—CNPq (140585/2011-7) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG—for scholarships. Technical and logistical support from Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ—Minas and Instituto Estadual de Florestas do Estado de Minas Gerais—IEF—are gratefully acknowledged.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Brazil is one of the most important endemic areas for leishmaniasis worldwide. Protected areas that are tourist attractions likely present an important risk of transmission of cutaneous leishmaniasis (CL). Furthermore, with the geographical expansion of visceral leishmaniasis (VL), several studies have recorded the occurrence of its vector, *Lutzomyia longipalpis*, and cases of human and canine VL in such tourist areas. The Parque Estadual do Sumidouro is an environmentally protected area located in the Brazilian Cerrado biome and in an important area endemic for leishmaniasis in the state of Minas Gerais. The purpose of this study was to monitor the sand fly fauna in areas of tourist activity in the park. Sampling was performed every month, from September 2011 to August 2013, using CDC light traps at six sites of differing environmental characteristics. Sampled specimens were identified following Galati (2003), and females were submitted to molecular techniques for the detection and identification of *Leishmania* DNA. A total of 4,675 sand fly specimens of 25 species belonging to nine genera were collected. The most abundant species were *Micropygomyia quinquefer*, *Lutzomyia renei* and *Pintomyia pessoai*, although only *Pi. pessoai* is implicated in the transmission of *Leishmania braziliensis*. The species accumulation curve reached saturation on the 16th sampling event. Species richness, diversity and evenness differed among the sampled areas. The seasonal curve was not determined by a single unique species, and no single species was the most abundant in all environments sampled. The main vector of *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Lutzomyia longipalpis*, accounted for only 5.35% of the specimens collected. Proven or suspected vectors of *Leishmania (Viannia) braziliensis* were recorded, and one female of the *cortellezzii* complex tested positive for *Le. braziliensis* DNA. Even with a low infection rate (0.62%), these data indicate the circulation of the parasite and reinforce the need for entomological and epidemiological surveillance in the park and its surroundings.

Introduction

Brazil is one of the most important areas of the world for the occurrence of endemic leishmaniasis. Given its high incidence and mortality rates in Brazil, much of the current attention has been given to urban foci of visceral leishmaniasis (VL). However, cutaneous leishmaniasis (CL) presents significant health problems in wild, rural and even urban and peri-urban areas [1] [2].

Environmentally protected areas that serve as tourist attractions may present an important CL transmission risk in southeastern Brazil. Typically, occupational exposure to CL transmission occurs when individuals are exposed to the focus of the disease, however, autochthonous cases have been recorded in urban and peri-urban areas [2]. With the geographical spread of VL, several studies have recorded populations of *Lu. longipalpis* and cases of human and canine VL in areas of more recent human settlement, including tourist areas [3] [4].

A survey of the protected area “Parque Estadual do Alto Ribeira”, situated in a region endemic for CL, found the sand fly *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), one of the main vectors of *Le. braziliensis*, to be the sixth most abundant sand fly species. This species had the highest rates of incidence in the camping area of the park where *Lu. longipalpis* was also recorded. Another study conducted in Bonito City, one of the main ecotourism destinations of Brazil, reported a high abundance of *Lu. longipalpis* as well as a high incidence of canine seroprevalence for *Leishmania*. Furthermore, *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), another main vector of *Le. braziliensis*, has been recorded in Bonito City. [5],[6].

The Parque Estadual do Sumidouro (Sumidouro State Park)–PES-, is situated in the Cerrado biome, known also as the Brazilian Savannah. The Cerrado is the second largest terrestrial biome in South America and occupies 22% of the land area of Brazil. Although the Cerrado is considered a global biodiversity hotspot, it is experiencing a remarkable amount of habitat destruction due to human occupation and activities such as urbanization and agricultural and coal production [7]. Such anthropogenic modifications can favor the occurrence of pathogens through the elimination of the natural habitats of reservoirs and vectors, thus causing the life cycles of these species to adapt to the modified environment [8], [9].

Knowledge of the risk of exposure to residents and tourists in these areas is essential for the surveillance and management of potential cases of leishmaniasis. Epidemiological data for areas frequently visited could be instrumental for the accurate diagnosis of leishmaniasis, and for the selection of treatment strategies, especially concerning tourists that return to non-endemic areas [10].

The purpose of the present study was to describe the sand fly fauna in PES, an area of protected Cerrado. The area is endemic for leishmaniasis, and has documented cases of both visceral and cutaneous human leishmaniasis. Located in PES is Lapinha’s cave, a taxonomically and biologically important site for the collection of *Lutzomyia longipalpis* [11] [12] [13] [14] [15].

Materials and Methods

Study area and collection of specimens

Sand flies were collected from six localities within PES of varying environmental characteristics, including type of vegetation, presence of rock formations, and degree of human disturbance. The PES is a thirteen-hundred hectare environmentally protected area located about 50 km from the city of Belo Horizonte, the capital of the state of Minas Gerais. The park is located in the Lagoa Santa karst region, with the relief being formed of carbonate rocks that are prone to dissolving with water [16] (Fig 1).

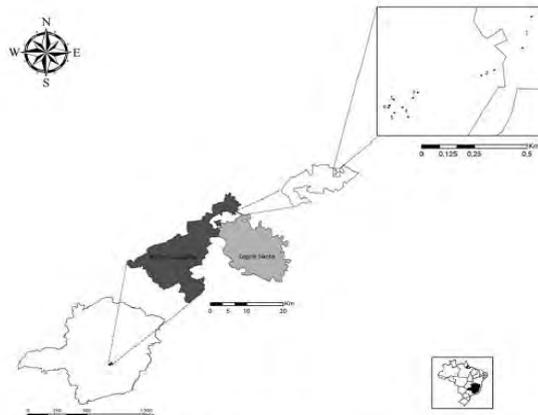


Fig 1. Map showing the location of PES and the location of sampling sites in the park. (1)—Park surroundings—peridomestic areas; (2)—Cerrado 1; (3)—Cerrado 2; (4)—Rupicolous vegetation; (5)—Cave entrance; (6)—Cave surroundings.

doi:10.1371/journal.pone.0134845.g001

The environment of each sampling site was briefly described considering characteristics that may favor the occurrence of sand flies. Environmental characteristics considered were those that related to:

- * Breeding, shelter and feeding on plants; presence and type of vegetation; presence of water collection sites; and the presence of rocks.
- * Haematophagic habit: presence of local fauna, including dogs.

The environmental characteristics of the collection sites are briefly described in [Table 1](#). The area sampled was 0.08 km², and the traps were arranged in a non-linear transect of 1000 meters. The selection of collection sites followed two criteria: (1) the sampling of all of the different environments of the park considering vegetation, topography and anthropogenic modification; (2) proximity to the trail most commonly used by tourists (the primary reason for the entomological surveillance program).

Collection procedures were approved by the Ministério do Meio Ambiente do Brasil (Ministry of Environment of Brazil)—(SISBIO: 15,237 and 30297–2) and the Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (State Forestry Institute of Minas Gerais) (072/11). Sampling took

Table 1. Environmental characteristics of the sand fly collection sites in PES from September 2011 to August 2013.

Collection site	Type of vegetation	Presence of livestock and dogs	Presence of stream, pond or dam	Presence of local fauna	Presence of rocks
Park surroundings—peridomestic areas	Forested/semi-deciduous forest with high level of anthropic modification	Hen house and/or dog kennel	No	Yes	No
Cerrado 1	Forested/semi-deciduous forest	Wandering dogs	No	Yes	No
Cerrado 2	Wooded area/deciduous forest	Wandering dogs	No	Yes	No
Rupicolous vegetation	Wooded area/rupicolous vegetation	Wandering dogs	No	Yes	Yes
Cave entrance	-	No	Yes	Yes	Yes
Cave surroundings	Wooded area/rupicolous vegetation	Wandering dogs	No	Yes	Yes

doi:10.1371/journal.pone.0134845.t001

place over two years and was performed every month over three consecutive days using HP-model CDC light traps [17] arranged uniformly in the different study areas.

Twelve light traps were used: two traps were placed in the backyards of houses located in the park surroundings (peridomestic areas) and 10 traps were placed inside the park itself. Of the traps placed within the park, two were placed in forested/semi-deciduous forest (Cerrado 1), two in wooded/deciduous forest (Cerrado 2), two in rupicolous vegetation, two next to the entrance to the Lagoa do Sumidouro cave, and two in the area surrounding the cave.

The sampling transect was about 1000 meters in length (corresponding to a section of the main tourist trail of the park), with an average of 200 meters between trap sites. A total of only 0.08 km² (6.15%) of the entire 13,000 km² of the park were sampled. Sampling took place from September 2011 to August 2013, with a total sampling effort of 20,736 hours.

Trapped specimens were identified according to the classification proposed by Galati (2003). Females belonging to the species *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1940) and *Evandromyia cortelezii* (Brethes, 1923), and belonging to the species *Pintomyia mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias & Brazil, 1994) and *Pintomyia christensenii* (Young & Duncan, 1994), were identified as belonging to the *cortelezii* complex and the *mamedei* complex, respectively, when morphological differentiation was inconclusive.

Female specimens collected up to April 2013 were processed for the detection of *Leishmania* DNA. These specimens were stored in DMSO 6% and frozen at -20°C. At the time of identification, the last three abdominal segments and the head of each female specimen were removed and mounted in Berlese liquid. Simultaneously, the gut was checked for the presence of blood. The remaining specimens were placed in 70% alcohol, prepared and mounted in Canada Balsam.

DNA extraction and polymerase chain reaction

DNA extraction employed the Puregene QIAGEN Gentra kit. The molecular target chosen for *Leishmania* DNA detection was the Internal Transcribed Spacer I (ITS I) of rDNA. [18]. The reaction protocol used was that established by Schonian et al 2003 [18] with some modifications. The positive controls were DNA of four reference strains: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75), and *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) at a concentration of 20 ng/μL. For species identification the amplified products were digested by the enzyme Hae III as described by Schonian et al 2003 [18].

If the restriction fragment analysis did not produce visible DNA bands, the whole fragment resulting from the PCR amplification of the ITS-1 region was sequenced. To purify the product QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) was used following the manufacturer's instructions. Next, a mixture was prepared containing 1 μL of purified products, 1 μL of each primer at a concentration of 5 pmol, antisense or sense (in separate tubes), 1 μL 5x Sequencing Buffer, 1 μL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, and distilled water for a final volume of 10 μL. The program used 35 cycles alternating between 95°C for 15 seconds and 65°C for 15 seconds. The ITS-1 fragment sequences were read using an ABI 3730xl DNA Analyzer automatic DNA sequencer.

Data analysis

The focus of the present study was to perform a descriptive analysis of sand-fly population patterns in areas of Cerrado with different kinds of vegetation. Margalef diversity and J evenness indices were used for ecological analyses of the study areas since they are non-parametric indices, which are less influenced by differing sampling efforts. The Margalef diversity index is

used to summarize information about the number of species and their abundance, and is employed to compare samples and locations. The J evenness index is used to describe the distribution of collected specimens among the species present, and thus is used to make inferences about species dominance in a population [19].

Descriptive analyses of all data were performed using Microsoft Excel (Office 2003). Graph Pad Prisma 4.0 software was used for statistical analyses and the PAST program was used for the ecological analyses. The entomological sampling sites were georeferenced using GPS—GARMIN eTrex-H for the spatial analysis of vector species (suspected and confirmed) population density. The coordinates and presence/absence data of vectors for each site were analyzed using ArcGIS 9.3 software.

For each study site, kernel estimation was used to infer vector density. This is a non-parametric statistical method of interpolation that identifies sites with the highest occurrence of a given event [20]. For kernel estimation in the present study, sand fly species were categorized as vectors (suspected or confirmed) or non-vectors of *Leishmania* species.

Sequences of the ITS-1 fragment were analyzed using Finch TV software (Geospiza, Inc.). Alignment of the sequences with sequences obtained from GenBank was performed using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Results

Sand fly fauna and environmental characteristics

A total of 4,675 sand fly specimens belonging to nine genera and 25 species were collected. The species with the highest abundance was *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), which accounted for 37.54% of the total. The next most abundant species were *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) and *Pintomyia pessoai* (Barretto & Coutinho, 1940), with 22.67% and 9.52%, respectively (Table 2). Considering these three most abundant species, only *Pi. pessoai* is implicated in the transmission of *Leishmania braziliensis*. Species richness and diversity were relative high among the samplings (Tables 2 and 3, Fig 2). The species accumulation curve reached saturation at the 16th sampling event when the value stabilized at 25 species. The six sites had distinctly different values for the species richness, diversity, abundance, and equitability indices. Even in the small region of this protected area sampled, there is considerable heterogeneity in the sand fly composition among sampled sites (Tables 1 and 2).

The area referred to as Cerrado 1 (forested/semi-deciduous forest) had the highest values for the diversity index, followed by Cerrado 2 (wooded area/deciduous forest); both areas had high values of equitability. The localities with the lowest values for species richness were the Cave entrance and the Rupicolous area; both had the lowest values of equitability as well. These latter two environments, however, had the highest values for relative abundance (Table 2).

There is no single species that dominates all of the studied environments in the park. For instance, in the park surroundings, specimens of the *cortezzi* complex and *Evandromyia cortezzi* were the most predominantly collected, whereas in areas of Cerrado 1 (forested/semi-deciduous forest) and Cerrado 2 (wooded areas/deciduous forest) *Pi. pessoai* predominated. The most abundant species in the area of rupicolous vegetation and in the environment surrounding the cave was *Mi. quinquefer*, and *Lu. renei* was the most common species in the cave entrance. The vector species *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani*, were collected from all environments studied in the park. *Migonemyia migonei* (France, 1920) and *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926) were collected from five and four study areas, respectively.

During both years of sampling the most productive period of sand fly collection was from December to April, whereas the least productive was in June and July (Figs 2 and 3). The species with the highest abundance values, *Mi. quinquefer* and *Lu. renei*, did not determine the

Table 2. Species of sand flies collected by site in the PES, sex, and total percentage from September 2011 to August 2013.

Sand fly species	Collected specimens per species		Number of collected specimens per study environments						Number of collected specimens per sex	
	Total number of specimens	% of collected specimens per species	Park surroundings	Cerrado 1	Cerrado 2	Rupicolous	Cave entrance	Cave surroundings	♂	♀
<i>Brumptomyia brumpti</i>	48	1.03	0	33	12	0	0	3	29	19
<i>Brumptomyia pintoii</i>	14	0.30	0	6	7	0	1	0	8	6
<i>Brumptomyia</i> sp.	24	0.51	0	10	4	1	3	6	-	24
<i>mamedei</i> complex	48	1.03	1	22	11	10	1	3	-	48
<i>cortelezzii</i> complex	168	3.59	57	5	57	11	23	15	-	168
<i>Evandromyia bacula</i>	3	0.06	0	1	0	1	0	1	-	3
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	137	2.93	62	1	25	22	17	10	122	15
<i>Evandromyia lenti</i>	22	0.47	5	2	12	2	0	1	10	12
<i>Evandromyia sallesi</i>	69	1.48	24	2	24	14	2	3	3	66
<i>Evandromyia spelunca</i>	3	0.06	2	0	0	0	1	0	-	3
<i>Evandromyia termithophila</i>	18	0.39	2	6	10	0	0	0	6	12
<i>Evandromyia</i> sp.	1	0.02	0	0	0	0	1	0	1	-
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	250	5.35	1	3	20	57	152	17	134	116
<i>Lutzomyia renei</i>	1060	22.67	1	5	4	18	1021	11	574	486
<i>Lutzomyia</i> sp.	65	1.39	4	14	8	14	20	5	40	25
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	1755	37.54	2	1	50	1258	359	85	687	1068
<i>Migonemyia migonei</i>	47	1.01	11	0	8	4	19	5	14	33
<i>Nyssomyia intermedia</i>	57	1.22	7	2	4	9	11	24	16	41
<i>Nyssomyia neivai</i>	3	0.06	0	1	0	1	1	0	2	1
<i>Nyssomyia</i> sp.	1	0.02	0	1	0	0	0	0	-	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	73	1.56	3	11	8	7	23	21	11	62
<i>Pintomyia christenseni</i>	22	0.47	0	14	5	3	0	0	11	11
<i>Pintomyia fischeri</i>	11	0.24	0	4	2	4	0	1	5	6
<i>Pintomyia mamedei</i>	4	0.09	0	3	0	1	0	0	-	4
<i>Pintomyia monticola</i>	6	0.13	0	1	2	2	0	1	1	5
<i>Pintomyia pessoai</i>	445	9.52	4	227	106	63	4	41	294	151
<i>Pintomyia</i> sp.	2	0.04	0	1	1	0	0	0	1	1

(Continued)

Table 2. (Continued)

Sand fly species	Collected specimens per species		Number of collected specimens per study environments						Number of collected specimens per sex	
	Total number of specimens	% of collected specimens per species	Park surroundings	Cerrado 1	Cerrado 2	Rupicolous	Cave entrance	Cave surroundings	♂	♀
<i>Psathyromyia aragai</i>	74	1.58	0	67	5	1	0	1	39	35
<i>Psathyromyia aragai</i> c.f.	3	0.06	0	3	0	0	0	0	-	3
<i>Psathyromyia barreto</i>	5	0.11	0	5	0	0	0	0	-	5
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	32	0.68	0	22	10	0	0	0	13	19
<i>Psathyromyia lutziana</i>	129	2.76	5	93	17	5	5	4	51	78
<i>Psathyromyia</i> sp.	1	0.02	0	1	0	0	0	0	-	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	75	1.60	1	8	14	3	24	25	18	57
Totals	4675	100	192 (4.11%)	575 (12.30%)	426 (9.11%)	1511 (32.32%)	1688 (36.11%)	283 (6.05%)	2090	2585

doi:10.1371/journal.pone.0134845.t002

pattern of the seasonal curve (Fig 3). The analyses of the seasonal curve in relation to the climatic parameters showed peaks of sand fly abundance during warm and humid periods. Among the climatic parameters analyzed, only relative humidity was not statistically correlated with the seasonal curve [Temperature (p-value < 0,0001 – Spearman correlation test), Precipitation (p-value = 0,0013 – Spearman correlation test), Air relative humidity (p-value = 0,0984 – Spearman correlation test)].

Leishmania DNA detection and identification

Of the total of 2,380 female specimens analyzed for the detection of *Leishmania* DNA, 1,014 were processed individually and 1,366 were grouped into 153 pools. These female sand flies were grouped according to species, collection date and collection site, with 2 to 20 individual sand flies in each pool (mean = 14). Only four individually processed samples tested positive for ITS-1 PCR (Table 4). The results of the RFLP reactions were not informative due to low DNA concentrations, and so the identification of samples was performed through the sequencing reaction. Only one sample was identified as *Le. brasiliensis* and it was from a female of the *cortezii* complex. Two samples were identified as *Crithidia fasciculata*, one as a female *Ev. sallesi* and another as a female *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima 1932). A female *Sciopemyia*

Table 3. Diversity indices for the sand fly fauna of the collection sites in PES from September 2011 to August 2012.

Indices	Sites					
	Park surroundings	Cerrado 1	Cerrado 2	Rupicolous	Cave entrance	Cave surroundings
Margalef diversity index SP Sumidouro	2.671	3.52	3.251	2.467	1.756	2.889
Equitability J index SP Sumidouro	0.6749	0.6068	0.8145	0.2471	0.4382	0.7478

doi:10.1371/journal.pone.0134845.t003

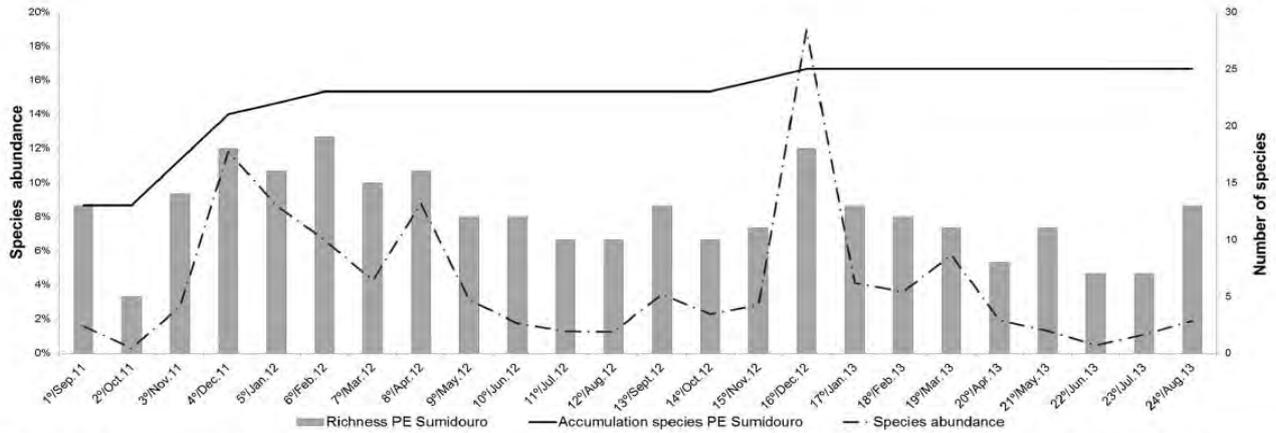


Fig 2. Species accumulation curve, abundance, and species richness of the sand fly fauna of PES from September 2011 to August 2013.

doi:10.1371/journal.pone.0134845.g002

sordellii (Shannon & Del Ponte, 1927) had a positive reaction for trypanosomatids. The natural infection rate of females of the *cortezzi* complex by *Le. braziliensis* was 0.62%.

Vectors density analyses

The map of suspected or proven vector species shows that they were distributed among all of the collection sites in PES, with the highest concentration of vector species occurring at the cave entrance and the areas of forested/semi-deciduous forest and wooded/deciduous forest. The area of rupicolous vegetation had intermediate vector densities, whereas the peridomestic localities surrounding the park had the lowest vector densities (Fig 4).

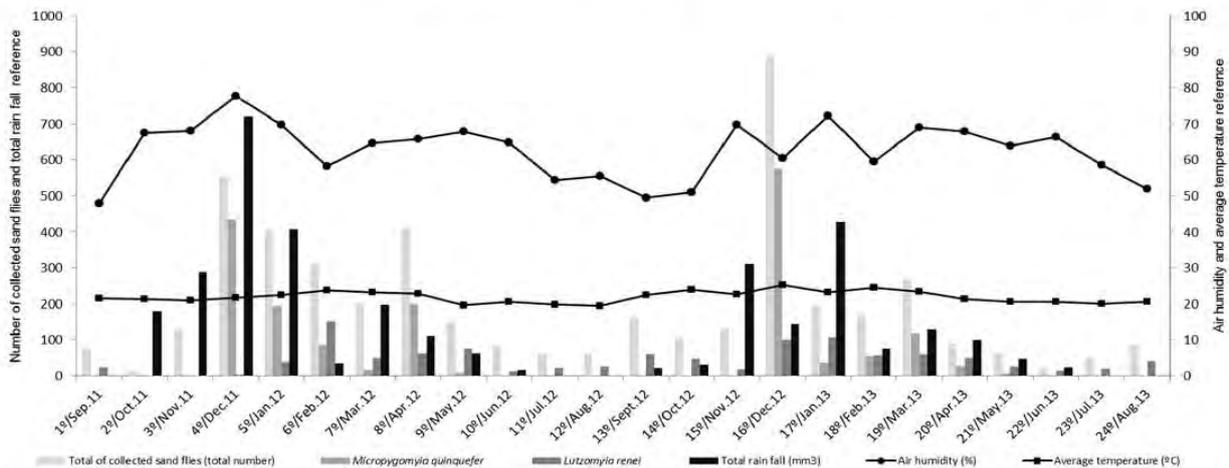


Fig 3. Relationship between seasonal variation of sand fly abundance and the climate parameters of total precipitation, relative humidity and mean temperature in PES from September 2011 to July 2013. The left Y-axis references the number of sandflies collected (total number) and the precipitation rate (mm³)—these data are represented by bars. The right Y-axis references the average temperature (°C) and relative air humidity (%)—these data are represented by lines with markers.

doi:10.1371/journal.pone.0134845.g003

Table 4. Results of DNA detection and identification of species of Trypanosomatidae according to species of sand fly, collection sites, and collection date in PES from September 2011 to August 2013.

Species	Sites	Collection date	ITS1-PCR	RFLP profile	Sequencing
<i>Ev. sallesi</i>	Park surroundings—peridomestic areas	Mar/12	Positive	Undefined	<i>Crithidia fasciculata</i> (id: 100%, ref: HM004585.1)
<i>Pa. lutziana</i>	Park surroundings—peridomestic areas	Mar/12	Positive	Undefined	<i>Crithidia fasciculata</i> (id: 100%, ref: HM004585.1)
<i>Sc. sordellii</i>	Cave surroundings	Mar/12	Positive	Undefined	Trypanosomatidae (id: 93%, ref: JN673399.1)
<i>cortelezzii</i> complex	Cerrado 2	Dec/12	Positive	Undefined	<i>Leishmania braziliensis</i> (id: 100%, ref: JX448549.1)

doi:10.1371/journal.pone.0134845.t004

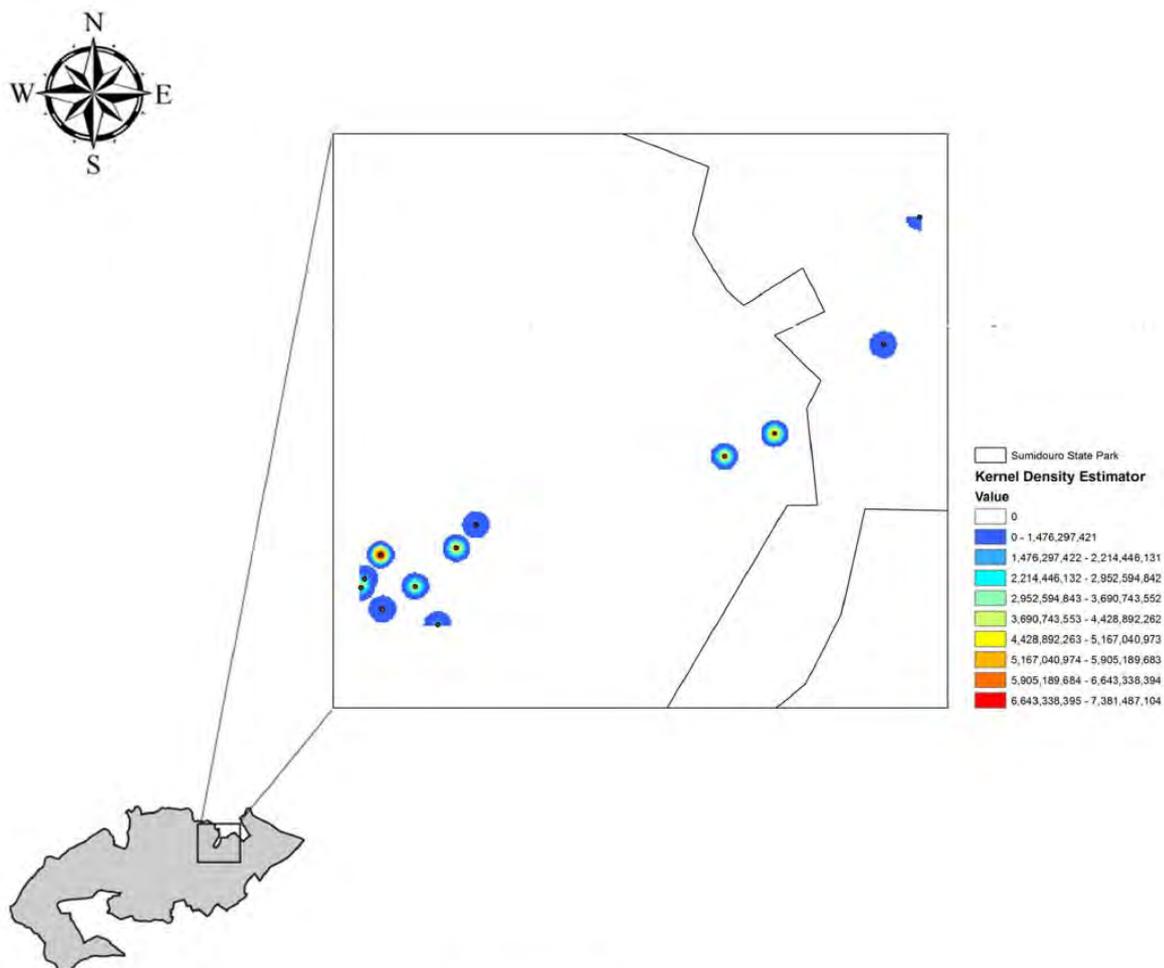


Fig 4. Map showing the Kernel density analysis of vectors in PES.

doi:10.1371/journal.pone.0134845.g004

Discussion

The PES is located in the municipalities of Lagoa Santa and Pedro Leopoldo, both of which have historical records of human cases of VL and CL and report cases of canine leishmaniasis. From 2009 to 2013, three cases of VL were documented in Lagoa Santa and two in Pedro Leopoldo. During the same time period, three cases of CL were reported in Lagoa Santa and six in Pedro Leopoldo [21].

Among the proven or suspected vector species collected in the park, *Lu. longipalpis* accounted for 5.35%. Although this species was collected in all of the environments sampled, it was most abundant at the cave entrance. This species was also collected in high numbers in less anthropogenically influenced habitats, with only one specimen being collected in the peridomestic environment.

The data of this study are consistent with the hypothesis that different populations of *Lu. longipalpis* have different behavior patterns in different environments. However, it may be that this species merely possesses an enormous ability to adapt to anthropogenically modified environments [22], [23], [24], [25].

A large number of species that are suspected or proven vectors of *Le. braziliensis* were documented in PES, such as *Ny. whitmani* [26]. Moreover, *Le. infantum* DNA was detected in females of *Ny. whitmani* in different areas of Minas Gerais State [27], [28]. This species has a tendency to adapt to anthropogenically influenced areas in spite of its greatest abundances in natural areas and forest environments [29], [30], [31].

Specimens of *Ev. sallesi* and *Ev. cortelezzii*, as well as specimens of the *cortelezzii* complex, are suspected of participating in the transmission cycles of *Leishmania* sp. These species are frequently collected in peridomestic environments, and the DNA of *Le. infantum* has been detected in both *Ev. sallesi* and *Ev. cortelezzii*. Furthermore, specimens of the *cortelezzii* complex have been found positive for *Le. braziliensis* DNA [28], [32]. In southeastern Brazil, *Ny. intermedia*, *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Mi. migonei*, *Pi. pessoai* and *Pi. fischeri* have been incriminated in the transmission of *Le. braziliensis*, [28], [29], [33], [34], [35], [36], [37], [38].

Species whose participation in the transmission cycles of leishmaniasis need to be further clarified were also collected, such as *Evandromyia lenti* (Mangabeira 1938) and *Sc. sordellii* [27], [39], [40], [41]. The remaining species of sand flies recorded in PES are not suspected to be involved in the transmission cycles of *Leishmania* spp.

So far the indices of species richness, diversity and abundance recorded among the park localities have been described through simple descriptive analysis. Additional analyses using non-parametric statistical methods provide a similar interpretation [19], [42].

In every sampling, the study areas that had elevated values of diversity remained relatively stable throughout the study period, which agrees with what is expected of an environmentally preserved area (Tables 1 and 2). In PES evenness was high and there was not a single species that represented more than 40% of the sand fly specimens collected in the park (Table 1). These data agree with other studies in which natural areas tended to have greater species richness and diversity. For example, a study conducted on Ilha Grande, RJ, Brazil, a recent transmission area of *Le. infantum*, higher species richness and abundance were found in areas with lower anthropogenic modification [38].

In a study in the state of Espírito Santo, Brazil, a similar pattern was found in tropical forest areas and the authors emphasize that conserved areas have greater opportunities for shelter and more sources of food for sand flies [43]. These data concur with classical ecological theories that postulate that the greater diversity of habitats favors the greater biodiversity of species [44].

The present data analysis shows that the environmental diversity of the park holds highly differentiated faunistic compositions even in proximate sampling sites. For instance, the species of the genus *Brumptomyia* [*Brumptomyia brumpt* (Larrousse, 1920) and *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932)] were not recorded from the peridomestic environments and had higher relative abundances in Cerrado 1 and Cerrado 2. This pattern of occurrence is consistent with other faunal surveys [31], [45], [46]. Similar distribution patterns were also observed for other species (Table 1).

Although sand flies have not traditionally been considered in ecological conservation studies, the data herein corroborates and reinforces studies that call for better strategies to protect the Brazilian Cerrado biome [47]. Given the ecological complexity of the sand fly fauna of PES, it could be inferred that other invertebrate groups of the region, that have not yet been investigated, could be under risk due to impacts to the entire biome. These findings in PES agree with general descriptions of the Cerrado biome; the environmental diversity of Brazilian Cerrado forms a complex mosaic of habitats with different vegetation types, which contributes to a non-uniform species distribution [7].

The biodiversity of the park area is clearly demonstrated by the seasonal curve, which is influenced by several species. For example, *My. quinquerfer* and *Lu. renei* are responsible for the highest peaks of sand fly occurrence in the park, however, their individual patterns differ. The pattern of the seasonal curve in PES is in accordance with other studies carried out in the city of Belo Horizonte and in the region of Lapinha's cave [11], [30]. However, these results differ from others studies conducted in Belo Horizonte in which peaks in warmer and rainy months are not so evident [48]. These results demonstrate that entomological monitoring is required for leishmaniasis prevention and control measures based on vector control strategies because seasonal patterns of variation are prone to change due to environmental factors and insect community composition.

Only one female of the *cortelezzi* complex was found to be positive for *Le. braziliensis* DNA. Even if representing a low infection rate (0.62%), this observation indicates the circulation of the parasite in the area and reinforces the need for entomological and epidemiological surveillance. It is important to note that the molecular marker used in this study, the ITS-1 region, was specifically designated for detecting the genus *Leishmania* [49], however, in this work the region was able to detect another genus of the family Tripanosomatidae; two females tested positive for the genus *Chritidia*.

The vector distribution map summarizes the distribution of epidemiological risk since it shows significant vector density. As reported in other studies, the risk is not equally distributed among sampling localities; there is a higher record of vector species, or potential vectors, in locations with certain environmental characteristics [30], [50], [51]. Modern public health practices now possess the tools necessary to analyze key points in the relationship between the events involved in human diseases [52], [53].

These results underscore the need for entomological vigilance in PES where the presence of vectors, and the proximity of important endemic areas, suggest the possible establishment of cycles involving the parasites. A total of 14 sand fly species with proven or suspected involvement in the transmission cycles of *Le. infantum* and *Le. braziliensis* in Brazil were recorded in PES. The main vector species of *Le. infantum*, *Lu. longipalpis*, was detected in this study, whereas 13 species related to the transmission cycles of *Le. braziliensis* were recorded. Furthermore, the tourist potential of the park and, the tendency for an increasing number of visitors, reinforce the need to establish entomological monitoring in the area. This type of situation has been described in other tourist areas in Brazil [38], [54].

It is not possible to ignore human factors in considering control measures of endemic diseases and improvements are needed in the way of entomological monitoring in order to

employ preventive actions. This need is reinforced by the increasing amount of tourism in the area [55].

Conclusions

Our data show the presence of confirmed and suspected vector species of *Leishmania infatum* and *Leishmania braziliensis* at all sampling points along the main tourist trail in PES. This, along with the finding of *Le. braziliensis* in one female of the *cortellezzi* complex, demonstrate the need for continuing entomological and epidemiological surveillance in PES.

Acknowledgments

The authors are grateful to the community of the Parque Estadual do Sumidouro for their collaboration in the field sampling process.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JD AF CMFG LS. Performed the experiments: JD AF CMFG LS ASR FDR JMNR AASP ACVMRL. Analyzed the data: JD AF CMFG LS FDR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JD AF CMFG LS. Wrote the paper: JD AF CMFG LS.

References

1. Brasil Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006. p. 122.
2. Ministério B, Vigilância S De. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2010.
3. Souza CF, Borges M a Z, Andrade AJ. Contribution to the knowledge of the phlebotomine sand flies fauna (Diptera: psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brazil. Neotrop Entomol. 2009; 38: 267–71. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19488518> PMID: 19488518
4. State SP, Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-andrade RM, Consales CA, Fátima E, et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley : 2. Parque Estadual do Alto Ribeira. 2010; 477: 477–487.
5. Aparecida E, Galati B, Marassá AM, Gonçalves-andrade RM, Consales CA, Bueno EFM. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province – 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. 2010; 54: 311–321.
6. Mato E De, Rachel A, Andrade O De, Lúcia V, Nunes B, Aparecida E, et al. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006–2007 Estudo epidemiológico das leishmanioses em área de turismo ambiental e. 2009; 42: 488–493.
7. Ministério do Meio Ambiente—Brazil [Internet]. 2014 p. 2014. Available: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>
8. Gomes A de C, Neves VLF de C. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo The strategy and prospects for the control of cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31: 553–558. PMID: 9859700
9. Correa Antonialli SA, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. J Infect. 2007; 54: 509–14. doi: [10.1016/j.jinf.2006.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.08.004) PMID: 16979241
10. Scarsbrick JJ, Chiodini PL, Watson J, Moody a, Armstrong M, Lockwood D, et al. Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. Travel Med Infect Dis. 2006; 4: 14–21. doi: [10.1016/j.tmaid.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2004.11.002) PMID: 16887720
11. Andrade Filho, J. D., Lima M. L. N., Falcão A. L., Brazil RP. Sazonalidade dos flebotomíneos dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais. Rev Bras Entomol. 1998; 42: 93–95.
12. Hooper a. M, Farcet J-B, Mulholland NP, Pickett J a. Synthesis of 9-methylgermacrene B, racemate of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lapinha), from the renewable resource, Geranium macrorrhizum essential oil. Green Chem. 2006; 8: 513. doi: [10.1039/b602875f](https://doi.org/10.1039/b602875f)
13. Yin H, Mutebi JP, Marriott S, Lanzaro GC—Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Med Vet Entomol. 1999 Feb; 13(1):72–7. doi: [10.1046/j.1365-2915.1999.00139.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00139.x) PMID: 10194752

14. Muto S, Nishimura Y, Mori K. Pheromone Synthesis, CXCVI [Synthesis of Germacrene-B and Its Extension to the Synthesis of (-)-9-Methylgermacrene-B, the Racemate of the Male-Produced Sex Pheromone of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil. 1999. Eur. J. Org. Chem., 2159–2165
15. Cardim MF, Rodas LA, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999–2011. Rev Saude Publica. 2013; 47: 691–700. doi: [10.1590/S0034-8910.2013047004454](https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004454) PMID: [24346660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24346660/)
16. Instituto Estadual de Florestas—[Internet]. 2013 p. 2013. Available: <http://www.ief.mg.gov.br/areas-protetidas/>.
17. Pugedo H, Barata RA, Franca-Silva JC, Silva JC, Dias ES. [HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects]. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38: 70–72. /S0037-86822005000100017 PMID: [15717102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15717102/)
18. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDF., Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47: 349–358. doi: [10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2) PMID: [12967749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12967749/)
19. Magurran AE. Measuring Biological Diversity. 2004- Blackwell Publishing Company. 2004. pp. 285–286. doi: [10.2989/16085910409503825](https://doi.org/10.2989/16085910409503825)
20. Saúde M da. Introdução à Estatística Espacial para Saúde Pública. Capacitação e atualização em geoprocessamento em saúde. 2007. p. 124. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>
21. Sistema Nacional de Agravos de Notificação [Internet]. 2014. Available: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanne/leishvi/bases/leishvbmef.def>.
22. Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. Insect Mol Biol. 2002; 11: 315–323. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144696>. PMID: [12144696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144696/)
23. Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP, et al. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Mol Biol Evol. 2002; 19: 1624–1627. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200489>. PMID: [12200489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200489/)
24. Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, et al. Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. J Mol Evol. 2004; 58: 754–761. doi: [10.1007/s00239-004-2586-y](https://doi.org/10.1007/s00239-004-2586-y) PMID: [15461432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15461432/)
25. Souza N a, Andrade-Coelho C a, Vigoder FM, Ward RD, Peixoto A a. Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103: 216–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425278>. PMID: [18425278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425278/)
26. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 811–827. /S0074-02762005000800001 PMID: [16444411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16444411/)
27. 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: 1212–1219. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175074> PMID: [21175074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21175074/)
28. Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva Sde O, Andrade AS, 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. 2010; 105: 1033–1039. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225201>. PMID: [21225201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21225201/)
29. 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: 972–976. doi: [10.1603/me09127](https://doi.org/10.1603/me09127) PMID: [21175043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21175043/)
30. Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, de Carvalho DAA, de 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 Trop. 2011; 117: 137–145. doi: [10.1016/j.actatropica.2010.11.007](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.11.007) PMID: [21110938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21110938/)
31. Nascimento BW, Saraiva L, Neto RG, Meira PC, Sanguinette Cde C, Tonelli GB, et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in the central-western state of Minas Gerais, Brazil. Acta Trop. 2013; 125: 262–268. doi: [10.1016/j.actatropica.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.005) PMID: [23178219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23178219/)

32. Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8: 407–414. doi: [10.1089/vbz.2007.0180](https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0180) PMID: [18429695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18429695/)
33. Foratini OP. *Entomologia Médica.* São Paulo, E. Blücher/ EDUSP; 1973. p. 658.
34. Rangel EF, de Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. [Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of visceral leishmaniasis of Rio de Janeiro]. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984; 79: 395–396. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6535924> PMID: [6535924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6535924/)
35. Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *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. doi: [10.1590/S0074-02762007005000035](https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000035) PMID: [17612769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17612769/)
36. Aguiar GM, de Azevedo AC, Medeiros WM, Alves JR, Rendeiro V. Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56: 143–149. doi: [10.1590/S0036-46652014000200010](https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200010) PMID: [24626417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24626417/)
37. Teodoro U, Salvia Filho VL, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira ME, et al. [Phlebotomines in an area of transmission of tegumentary leishmaniasis in the northern region of Parana State, Brazil: seasonal variation and nocturnal activity]. *Rev Saude Publica.* 1993; 27: 190–194. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115833> PMID: [8115833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8115833/)
38. Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, de Santana ALF, da Costa SM, da Costa Rego TAN, et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors.* 2013; 6: 325. doi: [10.1186/1756-3305-6-325](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-325) PMID: [24499568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499568/)
39. Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.* 1997. pp. 191–193. doi: [10.1590/S0301-80591997000100026](https://doi.org/10.1590/S0301-80591997000100026)
40. Sherlock IA, Maia H, Dias-Lima AG. [Preliminary results of a project about the ecology of Phlebotomus vectors of cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29: 207–214. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713612> PMID: [8713612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8713612/)
41. Carvalho GM, Brazil RP, Ramos MC, Serra e Meira PC, Zenobio AP, Botelho HA, et al. Ecological aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambuí, Brazil. *PLoS One.* 2013; 8: e77158. doi: [10.1371/journal.pone.0077158](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077158) PMID: [24130847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24130847/)
42. Barrantes G, Sandoval L. Conceptual and statistical problems associated with the use of diversity indices in ecology. *Rev Biol Trop.* 2009; 57: 451–460. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19928446> PMID: [19928446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19928446/)
43. Pinto Ide S, Ferreira AL, Valim V, Carvalho Fdos S, da Silva GM, Falcao AL, et al. 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: 90–96. doi: [10.1111/j.1948-7134.2012.00204.x](https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00204.x) PMID: [22548541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22548541/)
44. MEATYARD B. *Ecology—From Individuals to Ecosystems*, 4th ed., Michael Begon, Colin R. Townsend, John L. Harper, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 738 pages, Price £37.50 (paperback) ISBN: 1405111178. *Biological Conservation.* 2007. pp. 309–309. doi: [10.1016/j.biocon.2006.10.034](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.10.034)
45. Saraiva L, Lopes J dos S, Oliveira GBM, Batista F de A, 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2006. pp. 56–63. doi: [10.1590/S0037-86822006000100011](https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100011)
46. Perez J, Virgen A, Rojas JC, Rebolgar-Tellez EA, Alfredo C, Infante F, et al. Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109: 80–86. doi: [10.1590/0074-0276130224](https://doi.org/10.1590/0074-0276130224) PMID: [24271002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24271002/)
47. WWF—Brasil 2014 – Cerrado [Internet]. 2014 p. 2014. Available: http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/cerrado/%3E.
48. Souza CM De, 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: 795–803. /S0074-02762004000800003 PMID: [15761593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15761593/)
49. Dweik A, Schonian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of *Leishmania* species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007; 101: 399–407. doi: [10.1179/136485907X176436](https://doi.org/10.1179/136485907X176436) PMID: [17550645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17550645/)
50. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura AC, Timbo 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: 31–38. /S0074-02762006000100007 PMID: [16699707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16699707/)

51. Machado da Silva AV, Magalhães MDAFM, Peçanha Brazil R, Carreira JCA. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. *Geospat Health*. 2011; 6: 33–40. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22109861>. PMID: [22109861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22109861/)
52. Rushton G. Public health, GIS, and spatial analytic tools. *Annu Rev Public Heal*. 2003; 24: 43–56. doi: [10.1146/annurev.publhealth.24.012902.140843](https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.24.012902.140843)
53. Brasil Ministério da Saúde. *Introdução à Estatística Espacial para Saúde Pública*. Brasília— DF; 2007. p. 124.
54. De Souza CF, Quaresma PF, Andrade Filho JD, Bevilacqua PD. Phlebotomine fauna in the urban area of Timoteo, State of Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 2014; 134: 72–79. doi: [10.1016/j.actatropica.2014.02.019](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.019) PMID: [24613154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24613154/)
55. Gomes A de C. *Vigilância Entomológica. Informe Epidemiológico do SUS*. 2002 11: 79–90.