

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

**Epidemiologia das leishmanioses no distrito de
Barra do Guaicui, município de Várzea da Palma,
Minas Gerais, Brasil**

por

Cristiani de Castilho Sanguinette

Belo Horizonte

2015

TESE	DCS-CPqRR	C. C. SANGUINETTE	2015
------	-----------	-------------------	------

CRISTIANI DE CASTILHO SANGUINETTE

**Epidemiologia das leishmanioses no distrito de
Barra do Guaicui, município de Várzea da Palma,
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 Doutora em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo

José Dilermando Andrade Filho

Belo Horizonte

2015

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

S225e Sanguinette, Cristiani de Castilho.
2015

Epidemiologia das Leishmanioses em Barra do Guaiçui,
Minas Gerais, Brasil / Cristiani de Castilho Sanguinette. –
Belo Horizonte, 2015.

XXIII, 148 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 122 - 160

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/epidemiologia 2. Leishmania/parasitologia
3. Psychodidae/parasitologia 4. Reação em Cadeia da
Polimerase/métodos I. Título. II. Gontijo, Célia Maria
Ferreira (Orientação). III. Andrade Filho, José Dilermando
(Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Epidemiologia das leishmanioses no distrito de
Barra do Guaicui, município de Várzea da Palma,
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 Doutora em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo

José Dilermando Andrade Filho

Banca examinadora:

Prof. Dra. Célia 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. Gustavo Mayr de Lima Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'ana (UFMG) Titular

Prof. Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte: 23/10/2015

Este trabalho é dedicado aos meus grandes amores: Álvaro, Zinha,
Wilma e Gustavo e a todos que contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger, me guiar pelos bons caminhos, me dar forças para nunca desistir e colocar em meu caminho pessoas do bem.

A minha mãezinha, sempre um exemplo de dedicação à área da educação e a família. Amo você!

A minha orientadora, Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, agradeço pelo apoio, compreensão e ensinamentos durante estes quatro anos e mais os dois anos do mestrado. Que a vida lhe proporcione toda a realização e alegria que você sempre me ajudou a conquistar!

Ao meu primeiro orientador, Dr. José Dilermando Andrade Filho, pelos dez anos de ensinamentos, amizade, compreensão e apoio. Obrigada por todo conhecimento transmitido e carinho que sempre teve comigo!

A pesquisadora Alda Lima Falcão que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica e o amor pelos flebotomíneos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro e logístico durante a realização deste projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, CPqRR/FIOCRUZ, pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo conhecimento transmitido.

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

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas, pelo apoio na realização do estudo dos pequenos mamíferos.

Aos moradores de Várzea da Palma, MG, por disponibilizarem suas casas e histórias para que pudéssemos realizar este trabalho. Obrigada pela confiança e espero que estes resultados possam beneficiá-los.

Agradeço a Prefeitura Municipal de Saúde, Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma e o empenho e a dedicação de todos os funcionários envolvidos na realização deste projeto.

Ao Programa de Desenvolvimento de Ferramentas Tecnológicas em Saúde PDTIS/FIOCRUZ pela utilização de suas instalações.

Ao amigo Eduardo de Castro Ferreira pelos ensinamentos da metodologia molecular, dedicação, paciência e empenho. Agradeço principalmente, pela amizade e carinho que você e sua família sempre tiveram comigo.

A minha estudante de iniciação científica, Danyele Franca da Silva, que foi verdadeiramente um anjo na minha vida. Sua serenidade, competência e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho. "Minha linda filha", obrigada pelo carinho e amizade e espero de alguma maneira tê-la retribuído com algum conhecimento. Adoro você!

Aos meus amigos e colaboradores nos trabalhos de campo, Gabriel Tonelli, Aline Tanure, Felipe Dutra, Marina Antonio, Bruna Lacerda, Ana Paula Lusardo, Paula Cavalcante e Helbert Botelho. Obrigada pelas risadas e apoio durante os longos dias de trabalho!

A minha amiga Juliana Xavier Faustino pelo apoio com os trabalhos de campo, extrações de DNA, dissecação de flebotomíneos e, principalmente pela amizade e cumplicidade. Muito obrigada!

Ao meu amigo Rodolfo Stumpp que gentilmente me socorreu nos trabalhos de campo e análises estatísticas.

Aos colegas do Grupo de Pesquisas em Leishmanioses, em especial ao Rogério Pereira pelas conversas agradáveis e apoio diário e a Agnes pela ajuda com os experimentos dos pequenos mamíferos.

Aos demais colaboradores do projeto, pela enorme contribuição dada na execução e na finalização do trabalho.

A minha família pelo amor que passam diariamente e a certeza de um porto seguro.

As minhas amigas Deborah, Mariana, Fabiana Lara e Fernanda Trindade pela alegria da companhia.

Ao Álvaro quero agradecer por me proporcionar o maior e melhor título, o de mãe! Sua chegada me trouxe de volta o equilíbrio e a paz. Ainda não consigo acreditar na sorte que eu tive em ser sua mamãe! Eu simplesmente, AMO VOCÊ!

Ao Gustavo por compartilhar comigo um grande amor e estar ao meu lado dando apoio em todos os momentos da minha vida!

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças e sua epidemiologia somente pode ser compreendida pelo conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão, como reservatórios, vetores e espécies de parasitos envolvidos e suas relações ecológicas. O objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia das leishmanioses no distrito de Barra do Guaicui, município de Várzea da Palma, Minas Gerais. Foram realizadas no ano de 2012 cinco coletas de flebotomíneos em 24 casas da área urbana e doze coletas durante os anos de 2013 e 2014 em três ambientes distintos (urbano, transição e mata), utilizando armadilhas luminosas HP. As fêmeas coletadas foram identificadas e submetidas à verificação de infecção natural pela dissecação do tubo digestório e a detecção de DNA do parasito (LnPCR) em amostras individuais. Para o segundo período de estudo foram verificados e comparados os padrões de distribuição, a riqueza, uniformidade, e abundância dos flebotomíneos nas diferentes áreas. Para o estudo dos hospedeiros silvestres e sinantrópicos de *Leishmania* foram instaladas duas armadilhas, uma do tipo Sherman e outra do tipo gaiola, em cada uma das casas amostradas para o ano de 2012 e, além destes pontos foram definidas três trilhas, com 15 armadilhas tipo Sherman e 15 tipo gaiola por trilha, em área limítrofe ao perímetro urbano. No ano de 2013 as coletas de pequenos mamíferos foram conduzidas nos mesmos pontos de coleta dos flebotomíneos e utilizando a mesma metodologia. O estudo da infecção dos pequenos mamíferos foi realizado utilizando técnicas moleculares. Um total de 5.831 flebotomíneos pertencentes a quinze espécies e oito gêneros foi coletado e identificado. A espécie mais prevalente foi *Nyssomyia intermedia*, seguida de *Lutzomyia longipalpis*, importantes vetoras dos agentes etiológicos da forma tegumentar e visceral em humanos, respectivamente. A área urbana teve a maior abundância enquanto a área de transição teve a maior diversidade e uniformidade de espécies. *Nyssomyia intermedia* foi a espécie mais abundante na área urbana, enquanto *Evandromyia evandroi* foi a mais abundante na área de transição e *Ev. lenti* na área silvestre. Nenhuma forma flagelada foi encontrada pela técnica da dissecação. Foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* nas seguintes espécies: *Ny. intermedia* (0,9%), *Lu. longipalpis* (2,9%), *Ev. termitophila* (3,0%), *Ev. sallesi* (1,8%), *Ev. evandroi* (1,5%), *Ev. neivai* (1,1%), *Ev. lenti* (0,9%) e *Ev. walkeri* (9,0%) todas com DNA de parasitos do complexo *Le. braziliensis*. *Nyssomyia intermedia* (0,3%), *Ev. evandroi* (1,5%), *Ev. lenti* (1,8%), *Ev. sallesi* (1,2%), *Lu. longipalpis* (0,58%), *Ny. neivai* (1,1%) e *Psathyromyia lutziana* (33,3%) apresentaram positividade para parasitos do complexo *Le. donovani*. Das 47 amostras positivas para a presença de DNA de *Leishmania*, 34 (72,3%) eram provenientes da área urbana, três (6,4%) da área de transição e dez (21,3%) da área de mata. A fauna de pequenos mamíferos foi composta pelas espécies *Rattus rattus* (19,4%), *Didelphis albiventris* (44,4%) e *Thricomys apereoides* (36,1%). *Rattus rattus* foi capturado apenas na área urbana, *T. apereoides* apenas na área silvestre e *D. albiventris* nos três ambientes amostrados. As duas últimas espécies foram encontradas infectadas por *Le. braziliensis* na área de mata e na de transição, respectivamente. Nossos resultados contribuem para a compreensão do processo gradual de sinantropização das espécies de flebotomíneos encontradas no estado de Minas Gerais, demonstrando que o município de Várzea da Palma apresenta todas as características necessárias para a expansão das leishmanioses, visceral e tegumentar.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a complex of diseases and their epidemiology is understood only if all the links that compound its transmission cycle are known, such as reservoirs, vectors and parasites species and their ecological relationships. The aim of this research was to study the epidemiology of leishmaniasis in the District of Barra do Guaicui, municipality of Varzea da Palma, Minas Gerais State, Brazil. Five collections of phlebotomines were performed in 2012 in 24 houses in the urban area and another twelve collections from 2013 to 2014 in three distinct environments (urban, transition and wild forest), utilizing HP light traps. The collected females were identified and submitted to natural infection assessment through dissection of the digestive tract and parasite DNA detection (LnPCR) in individual samples. For the second period of study it was verified and compared the distribution richness, uniformity and abundance of sand flies in the different areas. For the study of wild and synanthropic hosts of *Leishmania* two traps were installed in each house sampled during 2012 and three tracks in a boundary area of urban perimeter were set, with 15 Sherman traps and 15 "cage" traps per track. Collections of small mammals were performed in 2013, in the same collections points of sand flies and with the same methodology used in 2012. The detection of *Leishmania* infection in small mammals was carried out through molecular techniques. A total of 5.831 phlebotomines belonging to fifteen species and eight genera were collected and identified. The most frequent species was *Nyssomyia intermedia* followed by *Lutzomyia longipalpis*, which are important vectors of the etiologic agents of cutaneous and visceral leishmaniasis in humans, respectively. The urban area had the highest abundance while the transition area has the highest diversity and uniformity of species. *Nyssomyia intermedia* was the most abundant species of the urban area, while *Evandromyia evandroi* was the most abundant in the transition area and *Ev. lenti* in the wild area. No flagellate forms were found by the dissection technique. *Leishmania* DNA was detected in the following species: *Ny. intermedia* (0,9%), *Lu. longipalpis* (2,9%), *Ev. termitophila* (3,0%), *Ev. sallesi* (1,8%), *Ev. evandroi* (1,5%), *Ev. neivai* (1,1%), *Ev. lenti* (0,9%) and *Ev. walkeri* (9,0%), all of them with DNA of *Le. braziliensis* complex. *Nyssomyia intermedia* (0,3%), *Ev. evandroi* (1,5%), *Ev. lenti* (1,8%), *Ev. sallesi* (1,2%), *Lu. longipalpis* (0,58%), *Ny. neivai* (1,1%) and *Psathyromyia lutziana* (33,3%) presented positivity for the *Le. donovani* complex. Out of 47 *Leishmania* positive samples, 34 (72,3%) were from the urban area, three (6,4%) from the transition area and ten (21,3%) from the wild area. The small mammals fauna was composed by the species *Rattus rattus* (19,4%), *Thricomys apereoides* (36,1%) and *Didelphis albiventris* (44,4%). *Rattus rattus* was captured exclusively in urban area, *T. apereoides* only in the forest area and *D. albiventris* in the three environments. The last two animals were found infected by *Le. braziliensis* in the wild and transitional areas, respectively. Our results contributes to understand the gradual process of synanthropism of the sand flies species found in the state of Minas Gerais, demonstrating that the municipality of Varzea da Palma has all the necessary characteristics for the expansion of leishmaniasis, visceral and cutaneous.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Município de Várzea da Palma, evidenciando o distrito de Barra do Guaicui, localizado ao norte do estado de Minas Gerais, Brasil.....	46
Figura 2: Localidades onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos e pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) nos anos de 2012, 2013 e 2014 no distrito de Barra do Guaicui, MG.....	51
Figura 3: Armadilhas utilizadas para a coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) no distrito de Barra do Guaicui, MG. a: armadilha Sherman; b: armadilha de arame galvanizado.....	54
Figura 4: Distrito de Barra do Guaicui, MG, evidenciando a área urbana (círculo branco) e as trilhas (linhas vermelhas) onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos e pequenos mamíferos no ano de 2012.....	55
Figura 5: Distrito de Barra do Guaicui, MG, evidenciando as áreas de coleta, onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos (pontos brancos) e de pequenos mamíferos (linhas vermelhas) no ano de 2013 e 2014.....	56
Figura 6: Percentual de flebotomíneos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, durante os meses de estudo nos anos 2012, 2013 e 2014.....	67
Figura 7: Total de flebotomíneos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, de acordo com a espécie e o ano de coleta.....	68

Figura 8: Percentual de flebotomíneos por espécie, coletados nos meses de março, junho, julho, setembro, outubro de 2012 no distrito de Barra do Guaiçui, MG..... 70

Figura 9: Número de espécimes de *Brumptomyia avellari* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaiçui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 75

Figura 10: Número de espécimes de *Evandromyia evandroi* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaiçui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 76

Figura 11: Número de espécimes de *Evandromyia lenti* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaiçui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 76

Figura 12: Gráfico representando a frequência das espécies de flebotomíneos coletadas de acordo com as áreas estudadas no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 78

Figura 13: Índice padronizado de abundância das espécies coletadas, por área de estudo, utilizando armadilhas automáticas luminosas no distrito de Barra do Guaiçuí, Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 79

Figura 14: Índice padronizado de abundância das espécies coletadas utilizando armadilhas automáticas luminosas no distrito de Barra do Guaiçuí,

estado de Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 80

Figura 15: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletados no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN – branco da reação; Amostras positivas: 2, 3, Ev. evandroi; 12, Ev. sallesi; 9, 10, 11, 16, Ny. intermedia; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*)..... 81

Figura 16: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletados no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN - branco da reação; Amostras positivas: 10, Ev. lenti; 7, 22, 23, Ev. sallesi; 1, Ev. walkeri; 8, 5, Lu. longipalpis; 4, 6, 9, 31, Ny.intermedia; 32, 33, Ny. neivai; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*)..... 82

Figura 17: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletados no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN - branco da reação; Amostras positivas: 5, 13, 14, 26, 29, Ev. evandroi; 27, Ev. sallesi; 18, Lu. longipalpis; 11, 12,17,31, Ny. intermedia; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*)..... 82

Figura 18: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas

coletados no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN - branco da reação; Amostras positivas: 4, 12, 20, Ev. evandroi; 9, 17, Ev. lenti; 18, Ev. termitophila; 19, 21, 35, Lu. longipalpis; 1, 6, 7, 16, Ny. intermedia; 2, 3, Ny. Neivai; 8, Pa. lutziana; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis* 83

Figura 19: Total de flebotomíneos encontrados com a presença de DNA de *Leishmania* spp., segundo espécie e localidade de estudo, no Distrito de Barra do Guaiçuí, Minas Gerais..... 87

Figura 20: Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) coletados nos anos de 2012 e 2013 no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. a: *Didelphis albiventris*; b: *Rattus rattus*; c: *Thrichomys apereoides*..... 88

Figura 21: Porcentagem de pequenos mamíferos coletados, segundo área de estudo, no período de janeiro a dezembro de 2013 no distrito de Barra do Guaiçuí, MG..... 90

Figura 22: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 12 e 13 – amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos de Barra do Guaiçuí - Várzea da Palma..... 92

Figura 23: Linha do tempo sobre a epidemiologia das leishmanioses no município de Várzea da Palma, MG, com ênfase para o Distrito de Barra do Guaicui (quadros na cor laranja), no período de 2001 a 2015.....112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos de leishmaniose tegumentar no município de Várzea da Palma, MG, no período de 2004 a 2013, estratificados entre o distrito de Barra do Guaicui, os bairros e a zona rural..... 42

Tabela 2: Número de casos de leishmaniose visceral no município de Várzea da Palma, MG, no período de 2004 a 2013, estratificados entre o distrito de Barra do Guaicui, os bairros e a zona rural..... 42

Tabela 3: Espécies de flebotomíneos e número de machos e fêmeas coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, nos meses de março, junho, julho, setembro, outubro de 2012 e no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 66

Tabela 4: Número e porcentagem de flebotomíneos coletados, de acordo com a espécie e sexo na área urbana do Distrito de Barra do Guaicui, MG, nos meses de março, junho, julho, setembro e outubro de 2012..... 69

Tabela 5: Número mensal de flebotomíneos coletados com armadilha luminosa HP, segundo mês, local de coleta e sexo no distrito de Barra do Guaicui, MG, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014..... 71

Tabela 6: Espécies de flebotomíneos coletados no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, por área de estudo e sexo, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014, e seus respectivos índices de diversidade (H) e uniformidade (J)..... 73

Tabela 7: Análise de Variância (ANOVA) das principais espécies de flebotomíneos coletados nas trilhas da área urbana, de transição e silvestre no distrito de Barra do Guaicui, estado de Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.....	74
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) das sete espécies mais prevalentes do estudo comparando o número de espécimes coletados por área de estudo.....	77
Tabela 9: Resultado da detecção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses de março/junho/julho/ setembro e outubro de 2012 e no período de março de 2013 a fevereiro de 2014 no distrito de Barra do Guaicui, MG.....	85
Tabela 10: Lista dos pequenos mamíferos coletados, por espécie, área de estudo e sexo, nos anos de 2012 e 2013, no Distrito de Barra do Guaicui, MG.....	88
Tabela 11: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, nos meses de março, junho, agosto e outubro de 2012.....	89
Tabela 12: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, no período de janeiro a dezembro de 2013.....	90

Tabela 13: Espécie de *Leishmania* identificada pela RFLP-*hsp70* por espécie de pequeno mamífero, tecido amostrado e área de estudo no distrito de Barra do Guaiçuí, Minas Gerais..... 93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C: Grau celsius

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CRNIF: Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxinucleosídeos trifosfatos

Ev: Evandromyia

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

g: gravidade

Le: Leishmania

LT: Leishmaniose tegumentar

Lu: Lutzomyia

LV: Leishmaniose Visceral

mg: miligramas

MG: Minas Gerais

min: minutos

ml: mililitro

mM: milimolar

mm³: milímetros cúbicos

NaCl: Cloreto de Sódio

ng: nanograma

nm: nanômetros

Ny: Nyssomyia

OMS: Organização Mundial de Saúde

Pa: Psathyromyia

pb: pares de bases

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH: Potencial hidrogeniônico

PM: peso molecular

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

SINAN: Sistema Nacional de Agravos Notificados

SSUrRNA: Small subunit Ribosomal RNA

U: unidade

WHO: World Health Organization

μl: microlitro

μm: micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Leishmanioses.....	24
1.2 Vetores das leishmanioses.....	29
1.3 Leishmanioses e os roedores.....	34
1.4 Leishmanioses e os marsupiais.....	38
1.5 leishmanioses em Várzea da Palma, MG.....	40
2 JUSTIFICATIVA.....	43
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 Área de estudo.....	46
4.2 Estudo dos flebotomíneos.....	48
4.2.1 Coletas com armadilhas luminosas automáticas.....	49
4.2.2 Processamento dos flebotomíneos coletados.....	51
4.2.3 Identificação dos flebotomíneos.....	52
4.2.4 Estudo da infecção natural e da detecção de DNA de Leishmania spp. nas fêmeas de flebotomíneos.....	52
4.3 Estudo dos pequenos mamíferos.....	53
4.3.1 Procedimentos éticos.....	53
4.3.2 Coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais).....	54
4.3.3 Identificação e coleta das amostras biológicas de pequenos mamíferos	57
4.4 Métodos moleculares para o estudo de Leishmania nos	57

flebotomíneos e nos pequenos mamíferos.....	
4.4.1 Extração do DNA.....	57
4.4.2 Nested PCR (LnPCR) para o gene SSUrRNA de Leishmania em amostras de DNA extraídas de flebotomíneos e pequenos mamíferos.....	59
4.4.3 PCR dirigida ao gene hsp70 de Leishmania em amostras de DNA extraídas de pequenos mamíferos.....	61
4.4.4 Identificação da espécie de Leishmania.....	61
4.5 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Estudo dos Flebotomíneos.....	65
5.1.1 Coletas com armadilhas luminosas automáticas.....	65
5.1.2 Distribuição, riqueza e abundância da fauna flebotomínica nos ambientes urbano, de transição e silvestre.....	70
5.1.3 Estudo da infecção natural e detecção de DNA de Leishmania spp. em fêmeas de flebotomíneos.....	80
5.2 Estudo dos pequenos mamíferos.....	87
5.2.1 Fauna de pequenos mamíferos não voadores.....	87
5.2.2 Detecção de DNA de Leishmania spp. nos roedores e marsupiais.....	91
6 DISCUSSÃO.....	94
6.1 Fauna flebotomínica.....	94
6.2 Infecção natural e detecção do DNA do parasito nas fêmeas de flebotomíneos.....	99
6.3 Pequenos mamíferos e a infecção por <i>Le. braziliensis</i>	107

6.4 Abordagem epidemiológica das leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, com ênfase para o Distrito de Barra do Guaicui.....	111
7 CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS	161
Anexo I – Licença para coleta de pequenos mamíferos não voadores (IBAMA).....	161
Anexo II – Licença para coleta e eutanásia de pequenos mamíferos (CEUA).....	162
Anexo III – Artigo publicado: Sanguinette CC, Silva DF, Stumpp RGAV, Rego FD, Tonelli GB, Tanure A, Gontijo CMF, Andrade Filho JD. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. Parasit vectors 2015; 8:428. DOI 10.1186/s13071-015-1003-2.....	163

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae* e à ordem *Kinetoplastida*. A principal forma de transmissão do parasito ocorre no momento da realização do repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo infectada. O local de desenvolvimento das promastigotas no sistema digestório do inseto foi um dos critérios utilizados para a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), (Lainson & Shaw, 1987). Os parasitos que se desenvolvem apenas nas porções anterior e média do intestino são agrupados no subgênero *Leishmania* (comportamento suprapilário) e os que apresentam uma fase de divisão no intestino posterior (desenvolvimento peripilário), pertencem ao subgênero *Viannia*. Estes dois subgêneros incluem 22 espécies patogênicas ao homem, sendo 15 delas já identificadas nas Américas (PAHO, 2013).

No Brasil o subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) é formado pelos complexos *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*, sendo representados pelas espécies *Le. (Le.) amazonensis* e *Le. (Le.) infantum* (Magill, 2000). Como representantes do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) estão as leishmânias do complexo *Leishmania braziliensis* e do complexo *Leishmania guyanensis*, sendo representada no Brasil pelas espécies *Le. (V.) braziliensis* e *Le. (V.) guyanensis*, respectivamente. Outras espécies identificadas em território brasileiro são *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) lindenbergi* e *Le. (V.) shawi*. As quatro últimas espécies foram identificadas em estados da região

Norte do país (Grimaldi & Tesh, 1993; Cunningham, 2002; Ashford, 2000; Van der Auwera e Dujardin, 2015).

O ciclo de vida do parasito é digenético (heteroxênico), alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, os flebotomíneos. Uma grande variedade de mamíferos pode atuar como reservatório, sendo os mais comuns os roedores e os canídeos. Entretanto, outros grupos podem albergar a infecção tais como: edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados, primatas incluindo o homem que é atingido acidentalmente pela infecção (Deane & Deane 1954; Lainson et al., 1985; Shaw, 2003; Quinnell & Courtenay 2009).

Em função da diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros, as leishmanioses apresentam um caráter variado de manifestações clínicas, sendo consideradas um complexo de doenças. Assim a epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida através do conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão, como reservatórios, vetores e espécies de parasitos envolvidos e suas relações ecológicas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de adquirirem a doença com aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano, sendo 500 mil casos relacionados à leishmaniose visceral (LV) e 1,5 milhões de casos à leishmaniose tegumentar (LT). Aproximadamente 59 mil mortes são registradas por ano e, recentemente, 98 países relataram transmissão endêmica, com aproximadamente 0,7 a 1,2 e 0,2 a 0,4 milhões de

novos casos por ano para LT e LV, respectivamente (WHO, 2015; Brasil, 2007).

O número de casos de leishmanioses tem aumentado em todo o mundo. No Brasil o número de casos de LT subiu de 6.335 em 1984 para 30.030 em 1996 (Brandão-Filho et al., 1999). De 1990 a 2013 foram notificados mais de 680 mil casos novos de leishmaniose, principalmente LT (Maia-Elkhoury et al., 2008; Alves, 2009; Brasil, 2013). Apesar destes dados as estratégias para o controle das leishmanioses, no Brasil, não mudaram ao longo dos últimos 60 anos, o que pode explicar por que a incidência da doença não diminuiu (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). As dificuldades na detecção da infecção, o acesso à informação, conhecimento das espécies de reservatórios e vetores são alguns dos obstáculos para um programa de controle eficaz. Mapas de risco considerando a incidência das leishmanioses no Brasil no período de 2001 a 2010 estimaram um maior número de pessoas infectadas nos estados de Minas Gerais e do Pará para leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea respectivamente (Karagiannis-Voules et al., 2013).

Em Minas Gerais é possível observar o aumento no número de casos de LT e LV nos últimos anos e segundo levantamento realizado no período de 2000 a 2013 pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), anualmente, são notificados no estado de Minas Gerais uma média de 410 casos de LV. Atualmente, em Minas Gerais, os municípios de Belo Horizonte, Montes Claros, Ribeirão das Neves, Janaúba, Santa Luzia e Paracatu correspondem a 56% das notificações do estado (Sousa et al., 2008).

Devido às altas taxas de detecção, mortalidade (LV) e morbidade associada à capacidade de causar deformidades em pacientes (LT) a Organização Mundial de Saúde considera as leishmanioses uma das seis doenças infecciosas de maior importância no cenário mundial (WHO, 2010).

O diagnóstico das leishmanioses leva em consideração seus aspectos clínicos e epidemiológicos (Gontijo e Carvalho, 2003), e a realização de exames laboratoriais (diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular). Estes métodos permitem a confirmação dos achados clínicos e podem fornecer informações epidemiológicas relevantes, possibilitando a identificação do parasito, norteando as medidas de controle e tratamento para a doença (Brasil, 2007).

Dependendo de fatores como a espécie de *Leishmania* e a susceptibilidade do hospedeiro, as leishmanioses podem ser classificadas em quatro formas clínicas principais: visceral, cutânea localizada, cutânea mucosa e cutânea difusa (Saravia et al., 1989).

A LV tem como agente etiológico duas espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *Le. donovani* na Ásia e na África, *Le. infantum* na Ásia, Europa, África e Américas (Lukes et al., 2007; Kuhls et al., 2011). Também já foram relatados casos de visceralização provocada por *Le. (L.) amazonensis* (Barral et al., 1991) e por *Le. (V.) braziliensis* em pacientes imunossuprimidos (Gontijo et al., 2002). Os vetores que transmitem o agente etiológico desta manifestação visceral da doença são flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* a principal vetora no

Brasil e *Lutzomyia cruzi* a espécie com papel vetorial restrito a algumas localidades da região Centro-Oeste (Santos et al., 1998; Missawa et al., 2011).

O cão é apontado como o principal reservatório doméstico do parasito causador da LV, servindo de fonte de infecção parasitária para o vetor mesmo quando eles não apresentam qualquer sinal clínico da doença. Assim, a detecção de animais infectados é crucial para o controle da leishmaniose visceral (Michalsky et al., 2005). As estratégias recomendadas pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose visceral no Brasil são baseadas em um conjunto de medidas, tais como o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, a investigação sorológica canina e a eutanásia dos cães soropositivos, pulverização sistemática de inseticida no domicílio e peridomicílio, programas de educação da comunidade e manejo ambiental (Brasil, 2006).

A LT é uma doença primariamente de áreas silvestres causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo as mais importantes a *Le. (V.) braziliensis* e a *Le. (L.) amazonensis*, ambas de ampla distribuição no território brasileiro e a *Le. (V.) guyanensis*, que ocorre na região Norte. As outras espécies, *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) shawi* e *Le. (V.) lindenbergi* contribuem para um número menor de notificações e são restritas aos estados do Norte e Nordeste (Lainson, 2010).

Nas últimas duas décadas tem sido observado o crescimento da endemia, principalmente em magnitude e expansão geográfica, com surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais

recentemente, na região Norte. O processo de expansão das leishmanioses levou a alterações na epidemiologia da LT com a notificação de casos autóctones da doença em áreas peri-urbana e urbana de cidades de médio e grande porte (Carvalho et., 2006; Silva et al., 2006). Algumas espécies de flebotomíneos vetoradas de leishmânias causadoras da LT no Brasil são: *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neiva*, *Nyssomyia whitmani*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Migonemyia migonei*, *Psychodopygus davisii*, *Pintomyia fisheri*, *Psychodopygus wellcomei* e *Nyssomyia umbratilis*.

A análise das circunstâncias de transmissão das espécies de *Leishmania* causadoras da LT em cada área estudada é complexa devido à diversidade de espécies de agentes etiológicos, vetores e reservatórios envolvidos no ciclo da doença. Este fato demonstra o desafio para o sistema de saúde em relação ao diagnóstico e tratamento, devido ao amplo espectro de lesões, dificuldades operacionais para o diagnóstico e toxicidade da quimioterapia (Teles et al., 2013). Um dos desafios em relação ao controle e o diagnóstico da LT é a falta de conhecimento sobre as condições epidemiológicas, especialmente sobre a distribuição das populações de flebotomíneos, a frequência e a caracterização destas espécies.

1.2 Vetores das leishmanioses

Flebotomíneos são insetos pequenos, medindo de 2 a 3 milímetros, pertencentes à família *Psychodidae* e ordem *Diptera*. A cor pode variar desde tonalidades de marrom a quase negro. Apresentam atividade vespertina a

noturna e podem ser encontrados em ambientes silvestres, rurais, peri-urbanos e urbanos. Os flebotomíneos iniciam suas atividades no crepúsculo vespertino.

Quanto à alimentação, ambos os sexos, sugam sucos vegetais, néctar de flores, frutos e soluções açucaradas (Smith; Halder; Ahmed, 1940,1941; Pessoa & Barreto, 1948; Deane; Deane; Alencar, 1955; Sherlock & Sherlock, 1961, 1972; Alexander & Usma, 1994). As fêmeas, além da alimentação de açúcares, também são hematófagas, exceto raríssimas espécies autógenas, pois necessitam de sangue humano ou animal para a maturação de seus ovários, conferindo a elas a importância na transmissão de agentes patógenos (Forattini, 1976; Sherlock, 2003).

Em todo o mundo são conhecidas, aproximadamente, 986 espécies de flebotomíneos, das quais, mais de 528 estão presentes nas Américas e destas, mais de 270 já foram registradas no Brasil (Galati, 2003; Ready, 2013; Andrade & Gurgel-Gonçalves 2015). De acordo com Galati (1995, 2003) os flebotomíneos vetores nas Américas são incluídos em duas subtribos: Lutzomyiina e Psychodopygina. Em Lutzomyiina destacam-se os gêneros *Lutzomyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia* e em Psychodopygina: *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia* e *Viannamyia*.

A maioria das espécies não desempenha papel na transmissão dos parasitos causadores das leishmanioses na natureza, pois, dentre outros fatores, não se alimentam do sangue dos animais que apresentam potencial como reservatório, e/ou podem ser incapazes de completar o desenvolvimento de espécies de *Leishmania* no trato digestório (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann, 2004). Menos de 10% das espécies de flebotomíneos têm sido

consideradas como vetores de *Leishmania*, e apenas cerca de 30 espécies têm demonstrado capacidade vetorial (Bates, 2007).

No vetor susceptível, as formas promastigotas de *Leishmania* precisam escapar da membrana peritrófica, aderir ao epitélio do intestino, multiplicar e se diferenciar em formas metacíclicas infectantes, que serão transmitidas para o hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo. Killick- Kendrick (1990) e Sacks (2001) apontam as moléculas do intestino médio de flebotomíneos, como por exemplo, as galactinas, como a chave determinante da competência vetorial destes insetos. O principal constituinte da superfície do parasito, o lipofosfoliglicano glicoconjugado (LPG) é responsável pela ligação do parasito à galactina no epitélio intestinal da *Leishmania major* em *Phlebotomus papatasi* (Pimenta et al. 1992; Kamhawi, 2006). No entanto, existem outras moléculas que não o LPG que medeiam esta ligação em outras espécies de *Leishmania* (Rogers et al., 2004; Mysková et al., 2007; Volf & Mysková, 2007). Após se ligarem ao epitélio intestinal, inicia-se uma fase de multiplicação ativa dos parasitos seguida da migração em direção ao segmento anterior do estômago e diferenciação para a forma infectante. Todos estes fatores demonstram a importância dos flebotomíneos na transmissão das espécies de leishmânias e sustentam o pilar de que a propagação das leishmanioses depende, em grande parte, da presença e distribuição dos vetores. Portanto, a identificação correta das espécies de flebotomíneos circulantes em áreas endêmicas e o conhecimento da sua ecologia são aspectos de grande importância para o entendimento da epidemiologia das leishmanioses.

Mudanças ambientais derivadas das ações humanas, como o rápido processo de urbanização observado em países emergentes como o Brasil, mudaram a ecologia de algumas espécies de flebotomíneos, e consequentemente a eco-epidemiologia das leishmanioses, levaram a um significativo impacto na distribuição e nas taxas de mortalidade da LV desde a década de 1980 (Aguilar et al., 1987; Marzochi e Marzochi, 1994; Werneck 2008, Oliveira et al., 2013). Assim, quatro novas tendências surgiram: a transmissão da LV em áreas totalmente urbanizadas, rápida disseminação nas cidades da região Nordeste e para várias cidades das regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, aumento do número de casos em áreas urbanas em comparação com áreas rurais e o surgimento de epidemias urbanas de grande escala com ciclos de dez anos (Harhay et al., 2011).

O processo de urbanização no Brasil ganhou intensidade a partir da década de 1950, devido à industrialização, modernização e as atividades agrárias. Entretanto, este processo não foi uniforme no país ocorrendo sem o devido planejamento com a ocupação irregular de áreas florestais e destruição de habitats naturais para a o desenvolvimento do vetor e dos reservatórios silvestres, favorecendo o contato direto entre os seres humanos, vetores e os reservatórios. Esta situação está associada com o hábito de alimentação eclético de algumas espécies de flebotomíneos e sua facilidade de adaptação às condições do ambiente antropizado e a diferentes temperaturas, o que pode ter contribuído para a urbanização, principalmente, da LV (Rangel e Vilela; 2008). Espécies como *Lu. longipalpis* principal vetor da *Le. infantum*, *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* vetores de *Le. braziliensis* são comumente coletadas

em áreas urbanas (Gontijo et al., 2005; Carvalho et al., 2009; Saraiva et al., 2011; Nascimento et al., 2013).

Para auxiliar na compreensão dos fatores que contribuem para estas mudanças, técnicas de biologia molecular estão se tornando ferramentas poderosas na pesquisa de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos. Portanto, informações mais detalhadas sobre os fatores de risco para a ocorrência das leishmanioses, como as espécies de flebotomíneos prevalentes e o risco de transmissão, podem ser acumuladas por esforços contínuos usando essas técnicas em regiões endêmicas. Além disso, o uso de métodos moleculares contribuirá não só para a investigação epidemiológica sobre as leishmanioses, mas também em estudos básicos sobre as interações parasito/vetor/hospedeiro (Desjeux, 2001; Choi, 2001).

Com o aumento da sensibilidade e especificidade na detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos propiciado pelas técnicas moleculares, independente do número, fase e localização do parasito no intestino dos insetos (Perez et al., 1994), mais espécies tem sido apontadas com potencial vetorial. É o caso de *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia cortelezii*, *Ny. intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*, importantes espécies suspeitas ou vetoras de *Le. braziliensis* no Brasil, encontradas naturalmente infectadas ou com a presença de DNA de *Le. infantum* (Saraiva et al., 2009 e 2010; Margonari et al., 2010; Carvalho et al., 2008 e 2010; Andrade et al., 2011). Embora os autores não possam incriminar essas espécies como vetoras para a transmissão de *Le. infantum*, alguns não rejeitam a possibilidade delas estarem envolvidas nos ciclos de LT e LV na

área estudada. Apesar da necessidade de analisar com cautela estes novos achados é provável que os mesmos despertem o interesse e novos conhecimentos sejam gerados na tentativa de elucidar as lacunas existentes no ciclo de transmissão das leishmanioses no ambiente urbano e, principalmente, em áreas onde o vetor comprovado do parasito não é encontrado.

1.3 Leishmanioses e os roedores

No Brasil, a participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores. Em 1970, Lainson e Shaw detectaram pela primeira vez *Le. braziliensis* em roedores do gênero *Oryzomys* no estado do Mato Grosso. Anos mais tarde, estes mesmos autores, trabalharam na região de Monte Dourado, norte do estado do Pará, procurando determinar o(s) reservatório(s) silvestre(s) para espécies causadoras da leishmaniose tegumentar e encontraram o roedor *Proechimys guyanensis* freqüentemente parasitado 15/57 (26%) por *Le. (Le.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972). Outros hospedeiros de *Le. amazonensis* são pequenos roedores silvestres como *Oryzomys* sp. (Lainson & Shaw, 1968) e *Akodon* spp. (Telleria et al., 1999).

O alto índice de infecção do gênero *Oryzomys* (18/36 ou 50%) no Mato Grosso bem como nas florestas de Utinga também levava a crer se tratar de um importante hospedeiro do(s) agente(s) causal(ais) da leishmaniose tegumentar (Lainson & Shaw, 1970). Além disso, o aspecto das lesões, geralmente do meio para a base da cauda, por vezes abarrotada de parasitos,

porém sem maiores conseqüências para o animal, fazia crer uma longa convivência entre ambos e fazendo deste roedor uma excelente fonte de infecção para o vetor (Nery-Guimarães et al., 1968, Lainson & Shaw, 1968, Lainson & Shaw, 1970).

Em 1972, Forattini e colaboradores, conseguiram isolar *Leishmania*, em roedores das espécies *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes* de área endêmica para LT no estado de São Paulo. Os autores aventam a possibilidade de o gênero *Oryzomys* ser importante reservatório do parasito neste estado, à semelhança do que foi observado por Lainson & Shaw (1970) para *O. concolor* no Mato Grosso. Um ano mais tarde e na mesma região estes autores isolaram o mesmo parasito, *Le. braziliensis* a partir de *O. capito laticeps*.

Mais tarde, na Venezuela, este parasito também foi isolado de *Rattus rattus* (rato preto) e *Sigmodon hispidus* (rato do algodão) o que enfatiza a importância dos roedores como prováveis reservatórios da LT (De Lima et al., 2002).

Brandão-Filho et al., (2003) em Amaraji no estado de Pernambuco conseguiram isolar *Le. braziliensis* de *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus*. Em Pernambuco foi detectada a presença de DNA de *Le. infantum* por PCR em amostra coletada do roedor silvestre *Nectomys squamipes* (rato da água) (Carvalho, 2005; Dantas Torres e Brandão-Filho, 2006). Enquanto no estado da Bahia Peterson et al., (1988) já haviam isolado parasitos de *Le. braziliensis* nesta mesma espécie de roedor.

Melo, 2008, em um total de 60 roedores capturados em área endêmica de Belo Horizonte/MG, 30% foram considerados infectados através da PCR dirigida ao kDNA de *Leishmania*, sendo o agente etiológico identificado como pertencente ao complexo *Le. braziliensis* através de RFLP e hibridização do DNA alvo com sondas subgênero específicas.

Em levantamento da fauna de roedores sinantrópicos e silvestres no município de Araçuaí, Minas Gerais, 18 espécimes do total de 62 roedores capturados estavam infectados por espécies dos complexos *Le. mexicana*, *Le. braziliensis* e *Le. donovani*. Parasitos destes três complexos de *Leishmania* foram identificados em espécimes de *Trichomys apereoides*, *O. subflavus* e *R. rattus* o que indica que esta última espécie possa participar do ciclo zoonótico doméstico da leishmaniose visceral e tegumentar em área urbana, devido aos seus hábitos sinantrópicos (Oliveira et al., 2005). Em Baturité, no estado do Ceará, a espécie *R. rattus* foi encontrada infectada por *Le. braziliensis* e considerada um reservatório em potencial (Vasconcelos et al., 2004) e no estado do Rio de Janeiro, Quinnel e Courtenay (2009) consideraram *R. rattus* como um hospedeiro de *Le. infantum*.

Em duas aldeias da Terra Indígena Xakriabá, uma área de transmissão intensa para LT, 97 pequenos mamíferos foram capturados com 13 exemplares de *T. apereoides*, dois de *Rhipidomys mastacalis* e um de *R. rattus* positivos para a presença de DNA de *Leishmania*. Os resultados mostraram que *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis* estavam circulando entre os mamíferos silvestres e sinantrópicos presentes na Terra Xakriabá, destacando a diversidade epidemiológica da LT na região (Quaresma et al., 2011).

Os espécimes reconhecidos como *T. apereoides* foram classificados, recentemente, em cinco espécies: *T. apereoides*, *T. laurentius*, *T. pachyurus*, *T. inermis* e *T. sp* (Braggio e Bonvicino, 2004; Borodin et al., 2006). O papel de *T. laurentius* na retenção de infecção e amplificação do ciclo de transmissão de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* foi avaliado por Roque e colaboradores (2010). Um total de 24 animais nascidos em cativeiro foi submetido a exames parasitológico, sorológico, hematológico, bioquímico, histológico e ensaios moleculares. *T. laurentius* mostrou ser capaz de albergar e manter a infecção para as duas espécies de *Leishmania* inoculadas. Ambas as espécies de *Leishmania* demonstraram a capacidade de invadir e manter-se em vísceras e pele de *T. laurentius*, e nenhum roedor apresentou lesão, alteração histológica, ou evidência clínica de infecção. Estes resultados demonstram que outros mamíferos silvestres podem estar envolvidos na manutenção do ciclo enzoótico *Le. infantum*, atuando como hospedeiros primários deste parasito.

Várias outras espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos foram registradas como hospedeiros, potenciais reservatórios ou reservatórios de *Leishmania* spp. no Brasil demonstrando a importância destes animais no estudo do ciclo de transmissão das leishmanioses. São exemplos as espécies *Necromys lasiurus*, *Holochilus scieurus*, *H. scieurus*, *Cerradomys subflavus*, *Mus musculus*, *Agouti paca*, *Cavia porcellus* e *R. norvegicus* (Silveira et al., 1991; Machado et al., 1994; Brandão-Filho et al., 2003; Marcelino et al., 2011; de Freitas et al., 2012; Lima et al., 2013; Lara-Silva et al., 2014; Ferreira et al., 2015).

1.4 Leishmanioses e os marsupiais

A ordem Didelphimorphia é a única ordem de marsupiais reconhecida nas Américas. Nesta ordem o gênero *Didelphis* é o mais disperso no continente, principalmente devido à sua notável capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos. Sua ocorrência é relatada desde o sudeste do Canadá até o sul da Argentina (Austad, 1988).

Os *Didelphis* spp. costumam ser encontrados com facilidade em florestas alteradas pela ação antrópica. São vistos com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento (Austad, 1988; Olifiers et al., 2005). Muito provavelmente, devido ao caráter sinantrópico, são os mais estudados em relação à infecção por *Leishmania* spp. (Travi et al., 1998b; Roque & Jansen, 2014). Estudos colocam estes animais na lista de preferências alimentares tanto de *Lu. longipalpis*, no Brasil (importante vetor da *Le. infantum* neste país) (Sherlock et al., 1984) como de *Pintomyia evansi* na Colômbia (Travi et al., 1994).

Algumas espécies de didelfídeos já foram encontradas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, como o *Didelphis* spp. pela *Le. infantum* e *Le. braziliensis* (Sherlock et al., 1984; Silva et al., 2005; Carvalho, 2005; Schallig et al., 2007) e *Le. amazonensis* (Lainson & Shaw, 1998). A presença de *Leishmania* spp. nestes animais tem sido observada em várias áreas brasileiras como na região Amazônica (Arias et al., 1981; Grimaldi et al., 1991), no estado da Bahia (Sherlock et al., 1984; Sherlock, 1996), em Amaraji, Pernambuco (Brandão-Filho et al., 2003); Barra de Guarituba, Rio de Janeiro

(Cabrera et al., 2003; Carrera et al., 2012); Manaus, Amazonas (Guerra et al., 2007); Bauru, São Paulo (Santiago et al., 2007), Belo Horizonte e São João das Missões, Minas Gerais (Schallig et al., 2007; Quaresma et al., 2011; Ferreira et al., 2015). Segundo Cabrera e colaboradores (2003) a presença de *Didelphis marsupialis* constitui um importante fator de risco para a transmissão de espécies de *Leishmania* para o homem.

Em Belo Horizonte/MG foram capturados um total de 34 marsupiais do gênero *Didelphis* e entre eles a taxa de infecção por *Leishmania*, detectada por PCR foi de 23,5% e o agente etiológico envolvido foi caracterizado pela RFLP e hibridização do DNA alvo com sondas subgênero específicas como pertencente ao complexo *Le. braziliensis* (Melo, 2008).

Gambás (*Didelphis* spp.) infectados por *Le. infantum*, assim como os cães, podem apresentar duas formas da doença: uma sub clínica ou inaparente, com apenas discretas alterações inflamatórias no fígado, baço e linfonodos, perceptíveis somente pela histopatologia e outra forma grave, os quais são encontrados macrófagos repletos de parasitas na pele e órgãos linfóides, necrose esplênica e esteatose hepática (Travi et al., 1998).

Portanto, em virtude de sua íntima associação com moradias humanas tornando possível o compartilhamento dos vetores e parasitos com o homem e o cão (Travi et al., 1994), vários pesquisadores apontam este animal como um forte candidato a reservatório (Arias et al., 1981; Arias & Naiff, 1981). Servindo de fonte para o repasto sanguíneo de diferentes espécies de flebotomíneos (Cutolo et al., 2014), seria o elo perfeito entre os ciclos silvestre e periurbano (Cabrera et al., 2003). As espécies de *Didelphis* infectadas podem

desempenhar um importante papel na epidemiologia das leishmanioses nos centros urbanos, além da manutenção do parasito na enzootia silvestre, o que faz com que sejam as espécies mais pesquisadas.

1.5 Leishmanioses em Várzea da Palma, MG

O primeiro caso de leishmaniose no município de Várzea da Palma foi registrado no ano de 2001 no distrito de Barra do Guaicui onde foi identificada a forma clínica cutânea. Desde então já foram notificados, de 2004 a 2013, 202 casos humanos autóctones de LT e 37 casos de LV (Tabelas 1 e 2). Apesar destas informações e do crescimento expressivo do município nos últimos anos, apenas no período de 2009 a 2010 foram realizados os primeiros trabalhos de investigação entomológica e inquérito canino no município de Várzea da Palma. Os dados demonstraram uma alta densidade de espécies de flebotomíneos vetores com predominância de *Ny. intermedia* (54,2%) e *Lu. longipalpis* (37,9%), com a presença de DNA de *Le. infantum*, associado a uma alta soroprevalência da infecção canina (24,6%). Apesar de apresentar uma população de aproximadamente 5.900 habitantes, segundo a Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, o distrito de Barra do Guaicui se destacou sendo responsável por 65,5% do total de espécimes de *Ny. intermedia* coletado, 27,8% de *Lu. longipalpis* e uma soroprevalência da infecção canina de 22% (Sanguinette, 2011). Após a realização deste estudo sobre as leishmanioses, em julho de 2011, o Departamento de Vigilância Sanitária e Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma deu início ao Programa de Controle de Leishmanioses com a realização da

borrifação das casas onde foi detectada a presença do vetor positivo para a presença de DNA de *Le. infantum*, eutanásia dos cães soropositivos e manejo ambiental consistindo de poda de árvores.

Estudo sobre a fauna e detecção de DNA de *Leishmania* spp. de pequenos mamíferos no município de Várzea da Palma são inexistentes. Entretanto, esta localidade apresenta uma vegetação de cerrado e caatinga, a qual é composta por aproximadamente 60 espécies de pequenos mamíferos (Bonvicino et al., 2002; Oliveira et al., 2005). Nestas regiões fitoecológicas, estes animais podem ocupar áreas de transição que têm, geralmente, características de ambos os biomas (Paglia et al., 2009; Quaresma et al., 2011). A caatinga apresenta abundância das espécies *Monodelphis domestica*, *D. albiventris* e *Micoureus demerarae* e espécies de roedores, incluindo *T. apereoides*, *Wiedomys pyrhorhinus*, *Cerradomys subflavus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Necomys lasiurus*, *Kerodon rupestres* e *Phyllomys lamarum*. A fauna de pequenos mamíferos do cerrado é variada e as espécies comumente encontradas são *Akodon cursor*, *B. lasiurus*, *C. subflavus*, *T. apereoides*, *D. albiventris* e *Gracilinanus agilis* (Oliveira et al., 2005).

Diante destes dados fica evidente a importância e a necessidade de realizar, valorizar e incentivar novas investigações como fonte de informações para a compreensão do ciclo de transmissão das leishmanioses no município de Várzea da Palma e, conseqüentemente, subsidiar o programa de controle da doença na região.

Tabela 1: Número de casos de leishmaniose tegumentar no município de Várzea da Palma, MG, no período de 2004 a 2013, estratificados entre o distrito de Barra do Guaicui, os bairros e a zona rural.

Localidade	Ano de Notificação									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Bairros de Várzea da Palma	36	18	19	29	11	10	9	13	9	6
Distrito de Barra do Guaicui	3	2	1	0	0	0	7	16	2	1
Zona Rural	1	0	3	1	2	0	0	2	0	1
Total	40	20	23	30	13	10	16	31	11	8

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG

Tabela 2: Número de casos de leishmaniose visceral no município de Várzea da Palma, MG, no período de 2004 a 2013, estratificados entre o distrito de Barra do Guaicui, os bairros e a zona rural.

Localidade	Ano de Notificação									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Bairros de Várzea da Palma	0	0	2	0	6	4	4	4	4	0
Distrito de Barra do Guaicui	0	1	2	0	2	3	5	0	0	0
Zona Rural	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	1	4	0	8	7	9	4	4	0

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG

2 JUSTIFICATIVA

O município de Várzea da Palma é uma região que vem apresentando casos humanos tanto de LV quanto de LT há mais de 10 anos, bem como a presença de flebotomíneos vetores demonstrando a ocorrência de transmissão ativa da infecção. Em estudo realizado anteriormente neste município foi observada alta densidade populacional de *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis*, importantes vetores de LT e LV respectivamente, o encontro destas espécies com a presença de DNA de *Le. braziliensis* e *Le. infantum*, além de uma alta soroprevalência em cães (em torno de 24%) dos quais foram isolados parasitos identificados como *Le. infantum* (Sanguinette, 2011). Estes achados configuram uma situação preocupante para o município, pois são fatores importantes para a disseminação das leishmanioses.

O distrito de Barra do Guaicui, pertencente ao município de Várzea da Palma, apresentou um quadro epidemiológico interessante e diferente daquele classicamente descrito para a transmissão da LV. A espécie *Lu. longipalpis* é o vetor confirmado de *Le. infantum* no Brasil, entretanto a espécie com maior densidade populacional foi a *Ny. intermedia* que apresentou um elevado número de espécimes com a presença de DNA de *Le. infantum*. Nos domicílios ou próximos a estes onde os espécimes de *Ny. intermedia* foram coletados foram registrados casos humanos de LV e encontrados cães infectados por *Le. infantum*. Assim, este estudo visou aprofundar o conhecimento acerca dos ciclos de transmissão de *Leishmania* pela detecção e identificação da espécie em diferentes hospedeiros vertebrados e vetores. Estas informações poderão descrever de forma mais precisa a situação atual, e apresentar caráter

previdente, possibilitando o estabelecimento de medidas de controle e vigilância epidemiológica mais eficazes na região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os aspectos epidemiológicos das leishmanioses, relacionados aos flebotomíneos e aos pequenos mamíferos no distrito de Barra do Guaicui, Várzea da Palma, Minas Gerais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a fauna flebotomínica do Distrito de Barra do Guaicui, MG, em área urbana, de transição e silvestre;
2. Estabelecer a distribuição, riqueza e abundância das espécies de flebotomíneos nestes três ambientes estudados;
3. Verificar a presença de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos;
4. Realizar o levantamento das espécies de roedores e marsupiais presentes no distrito de Barra do Guaicui;
5. Detectar a infecção por *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais;
6. Identificar a (s) espécie (s) de *Leishmania* detectada (s) em flebotomíneos e nos pequenos mamíferos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O Município de Várzea da Palma está localizado na região norte de Minas (Figura 1), na microrregião de Pirapora, também conhecida como microrregião do Médio São Francisco. É representado por uma área de 2.195,653 km² e uma população estimada em 38.213 habitantes (IBGE, 2014).

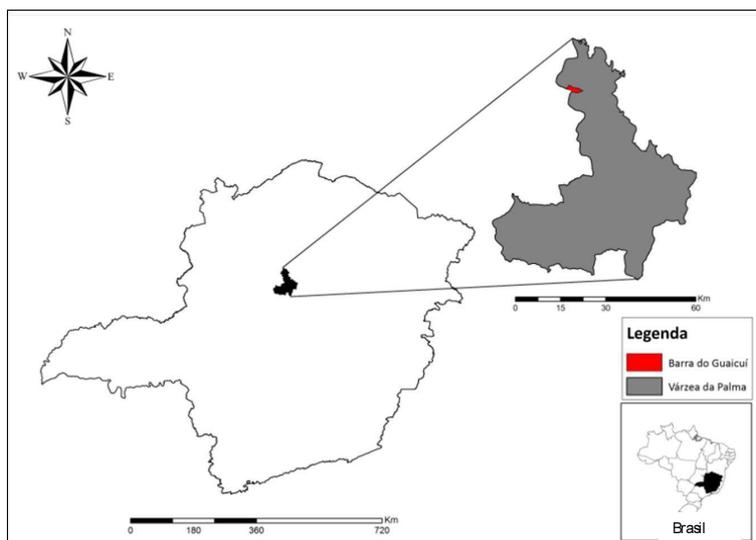


Figura 1: Município de Várzea da Palma, evidenciando o distrito de Barra do Guaicuí, localizado ao norte do estado de Minas Gerais, Brasil.

A cidade surgiu a partir da inauguração da Estação Ferroviária em 1º de Fevereiro de 1910. Sua emancipação político-administrativa se deu pela Lei nº 1.039 de 12 de dezembro de 1953. Por estar na região mineira da SUDENE (ADENE), Várzea da Palma foi beneficiada, com programas de incentivos à indústria, o que possibilitou a criação de seu parque industrial, hoje o terceiro

do Norte de Minas. Com todas estas vantagens, o município dispõe de mecanismos para a implantação de projetos industriais, pecuários, agrícolas e minerais (argila, arenito, quartzo e filito).

O município conta com o Distrito de Barra do Guaicui, integrado pela Lei 1.039 de 12 de dezembro de 1953, além dos povoados de Buritis das Mulatas, Buriti da Porta, Pedra Santana, Chapadinha, Carmo, Cachoeira, Água Branca, Bananal, Piedade e Placa do Queijo.

Guaicui veio a se constituir de dois arraiais, o da Manga e o da Porteira, distante um do outro cerca de três quilômetros. Até 1720 a região estava sob o domínio da Bahia, pertencendo à Vila da Cachoeira. O arraial foi fundado em 1679 por Manuel de Borba Gato, componente da bandeira de Fernão Dias. A localização do povoado às margens do Rio das Velhas com o São Francisco permitia fácil acesso navegável ao Sabarabussu, hoje Sabará, a Bahia e a Pernambuco. Em 1775 foi o povoado elevado à categoria de Paróquia, sendo depois, em 1778, sede florescente do Julgado de Nossa Senhora do Bom Sucesso e Almas da Barra do Rio das Velhas, subordinado ao Arcebispado da Bahia. Em 1845 já era freguesia e, por lei de 16 de outubro de 1861, passou a ser vila com 3.000 habitantes e seu nome foi mudado para Guaicui. Há mais de um século, Rocha (1988) em Memórias Históricas de Minas Gerais, assim descrevia Guaicui.

Barra do Guaicui está localizado a 67 km da sede deste distrito, Várzea da Palma, a 22 km de Pirapora, 140 Km de Montes Claros e a 360 km de Belo Horizonte. Apresenta altitudes variando entre 480 a 800 m, com uma cadeia de montanhas que faz ligação com a Serra do Cabral (IEF, 2014). O clima é

classificado como tropical de savana com estação seca de inverno, segundo a classificação de Köppen (Kottek et al, 2006).

O bioma no distrito é o cerrado, apesar de alguns pontos de área aberta a leste de Várzea da Palma apresentar influência da caatinga. Também são encontrados pequenos fragmentos de mata em diversos estágios de sucessão formando mosaicos de vegetação que variam em complexidade indo de capoeiras a matas mais densas (KIRWAN et al, 2004). As fitofisionomias predominantes são campo, cerrado *sensu strictu* e floresta estacional decidual montana e as áreas de vegetação mais preservadas são encontradas em altitudes mais elevadas (IEF, 2014).

O município de Várzea da Palma pertence à microrregião de Pirapora sendo formada por 10 municípios banhados pelas Bacias do Rio São Francisco, Rio das Velhas, Jequitai e Paracatu. Nessa microrregião foram registrados 243 casos de LT no período de 2001 a 2006 e 10 casos de LV (SINAN, 2008), porém esses números não expressam a realidade atual dos municípios, pois apenas para Várzea da Palma já foram registrados, segundo a Secretaria de Saúde do município, 11 casos de LV de janeiro de 2003 a julho de 2008 (Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma).

4.2 Estudo dos flebotomíneos

4.2.1 Coletas com armadilhas luminosas automáticas

As coletas sistematizadas dos flebotomíneos foram realizadas durante o período de março de 2012 a fevereiro de 2014, destinadas ao estudo da fauna e a observação da infecção natural e detecção de DNA de *Leishmania* spp.. As armadilhas utilizadas neste tipo de coleta foram do tipo luminosas automáticas, modelo HP (Pugedo et al., 2005). Estas armadilhas foram expostas durante três noites consecutivas das 18:00 as 6:00 horas, totalizando 36 horas de esforço amostral para cada armadilha.

No ano de 2012 as coletas sistematizadas foram realizadas nos meses de março, junho, julho, setembro e outubro, utilizando 24 armadilhas na área urbana, com a finalidade de verificar a presença de DNA e a infecção natural por *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos.

As armadilhas foram expostas no peridomicílio das casas, da área urbana do distrito de Barra do Guaicui, e quando presente, em anexos como galinheiro, chiqueiro ou canil. Os pontos de coleta foram selecionados de forma aleatória, abrangendo ao máximo a área selecionada para a realização do estudo.

Para o período de março de 2013 a fevereiro de 2014 cinco pontos foram selecionados para coleta dos flebotomíneos em três áreas distintas: urbana ou antrópica, transição ou hemi-sinantrópica e silvestre ou mata (Figura 2).

A área urbana ou antrópica (A) está localizada no centro do distrito de Barra do Guaicuí, contando com uma população de 5.000 habitantes, muitas

casas de alvenaria e algumas áreas desocupadas, tomadas por pasto sujo. A vegetação nativa, do tipo Cerrado *sensu strictu* é praticamente inexistente, sendo substituído por outros tipos de plantas, principalmente mangueiras. Sofre alagamentos durante a época de chuvas, devido a grande proximidade do Rio das Velhas.

A área de transição ou hemi-sinantrópica (T1) está localizada em um vilarejo afastado com poucas construções próximas. As casas ficam a uma distância de 10 metros da floresta contando com a presença de animais como cavalo, cabra, galinha e cão, sendo criados livremente. A vegetação nativa, do tipo Floresta Estacional Decidual Montana, está presente, apesar de ser bastante utilizada pelos moradores como fonte de lenha. Além disso, pontos próximos da área foram utilizados como pasto e para construção de moradias.

A área silvestre (T2, T3 e T4) foi amostrada em três pontos sendo que estes se encontram afastados das habitações humanas e apresentam vegetação nativa do tipo Floresta Estacional Decidual Montana. Este tipo de floresta tem como principal característica duas estações bem marcadas, uma chuvosa e outra de uma longa seca, em que mais de metade da vegetação perde suas folhas, permitindo a presença de matéria orgânica no solo. A caracterização das áreas descrita acima foi realizada por Sanguinette et al (2015).

Assim, mensalmente, foi instalado um total de dez armadilhas luminosas automáticas sendo seis na área silvestre, duas em cada um dos três pontos amostrados, duas na área de transição e duas armadilhas no peridomicílio das casas da área urbana. As coletas nestas áreas foram conduzidas para a

realização do estudo comparativo das espécies coletadas nos diferentes ambientes selecionados.



Figura 2: Localidades onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos e pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) nos anos de 2012, 2013 e 2014 no distrito de Barra do Guaicui, MG.

4.2.2 Processamento dos flebotomíneos coletados

As armadilhas foram retiradas a cada exposição para a realização da triagem e sexagem dos flebotomíneos. Os machos foram retirados das armadilhas utilizando o capturador de Castro, em seguida foram acondicionados em tubos de ensaio contendo álcool a 70° e posteriormente

preparados, montados e identificados, de acordo com as técnicas de rotina adotadas pelo Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. As fêmeas foram acondicionadas em potes próprios para a criação de flebotomíneos, contendo em seu fundo uma camada de gesso e tampados com tecido filó, onde foi oferecida solução açucarada as mesmas. Estas foram levadas ao laboratório e destinadas à pesquisa de infecção e a presença de DNA de *Leishmania* spp.

4.2.3 Identificação dos flebotomíneos

Todos os flebotomíneos coletados foram identificados ao nível de espécie pela microscopia óptica, dando prioridade à observação de estruturas que seguem a proposta do Grupo Cipa (1991) e seguindo-se a classificação proposta por Galati (2003). As fêmeas foram identificadas através das espermatecas, utilizando-se para isto, os últimos segmentos do abdômen. Também foi utilizada como caracter taxonômico na identificação específica, a visualização do cibário das fêmeas, mantendo no momento da dissecação a parte ventral da cabeça voltada para cima. A abreviação do nome genérico neste estudo segue a proposta de Marcondes (2007).

4.2.4 Estudo da infecção natural e da detecção de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos

Para a verificação da infecção natural foi utilizada a técnica de dissecação. A técnica da dissecação consiste em retirar o tubo digestório dos insetos em salina tamponada com o auxílio de dois estiletos entomológicos. Após este procedimento é retirado o corpo da fêmea do flebotomíneo e colocado sobre o intestino uma lâminula. O corpo é acondicionado em microtubo e a lâmina contendo o intestino é examinada em microscópio óptico para visualização de formas flageladas. Comprovando a ausência de formas flageladas a amostra é considerada negativa e o intestino acondicionado no mesmo tubo onde está o corpo para análises moleculares, referentes ao estudo da infecção por *Leishmania* spp., e a identificação da espécie.

A verificação do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada pela pesquisa de DNA do parasito nas fêmeas coletadas, sendo que estas não poderiam apresentar sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen. Este método foi realizado utilizando-se uma Nested PCR e a identificação da espécie de *Leishmania*, até complexo, foi realizada pela técnica do sequenciamento.

4.3 Estudo dos pequenos mamíferos

4.3.1 Procedimentos éticos

O projeto obteve licença de número 38834-1 do órgão do Ministério de Meio Ambiente do Brasil, Instituto Brasileiro para o meio Ambiente (IBAMA) para a coleta e eutanásia animais (Anexo 1). O presente projeto também foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz sob o protocolo de número 32/13-1 (Anexo 2).

4.3.2 Coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais)

Todos os procedimentos de captura e coleta de amostras dos animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram realizadas coletas de pequenos mamíferos utilizando armadilhas do tipo Sherman e armadilhas do tipo “gaiolas” de arame galvanizado (35x12x12 cm) durante os meses de março, junho, agosto e outubro de 2012 na área urbana do Distrito de Barra do Guaicui (Figura 3).



Figura 3: Armadilhas utilizadas para a coleta de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) no distrito de Barra do Guaicui, MG. **a:** armadilha Sherman; **b:** armadilha de arame galvanizado.

Foram expostas duas armadilhas, uma Sherman e uma de arame, no peridomicílio de cada uma das 24 casas onde foram colocadas as armadilhas para coleta de flebotomíneos, totalizando 48 armadilhas. Além destes pontos foram definidas três estações (trilhas) em área limítrofe ao perímetro urbano para coleta dos pequenos mamíferos: uma em área de plantação de cana de

açúcar, outra em uma área de pastagem e por último, uma trilha á margem direita do Rio das Velhas (Figura 4).

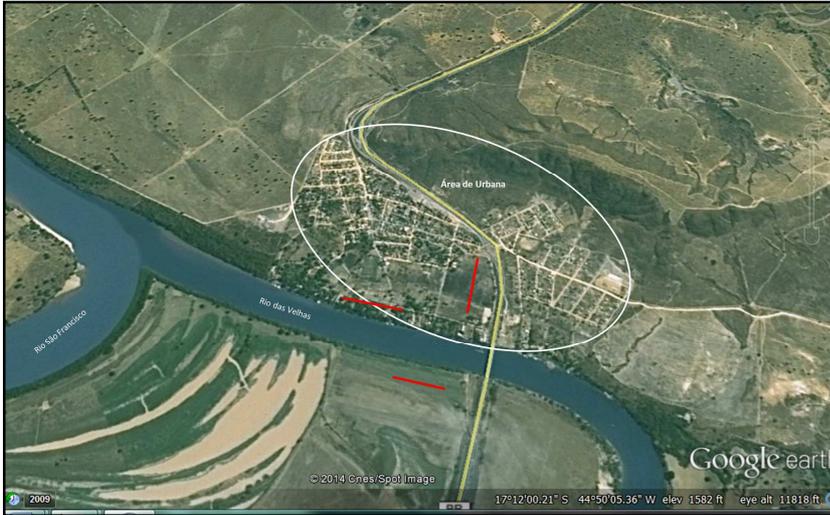


Figura 4: Distrito de Barra do Guaicui, MG, evidenciando a área urbana (círculo branco) e as trilhas (linhas vermelhas) onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos e pequenos mamíferos no ano de 2012.

Para definição das trilhas foram montados transectos para a disposição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher & Alho, 1989; Paglia et al., 1995). Cada trilha era composta por 15 pontos, distantes aproximadamente 20 metros um do outro, com duas armadilhas (Sherman e gaiola de arame) dispostas em cada ponto, totalizando 30 armadilhas por trilha e 138 armadilhas, somando as armadilhas das trilhas e das casas, para o ano de 2012.

No ano de 2013 foram realizadas coletas mensais no período de janeiro a dezembro, com a exposição de 150 armadilhas, 75 armadilhas tipo Sherman e 75 do tipo gaiola de arame, distribuídas em uma trilha montada na área urbana, uma em área de transição e três em área de mata. Também foram realizadas coletas sistematizadas de flebotomíneos nestas trilhas (Figura 5). Assim, para o estudo dos pequenos mamíferos, nos anos de 2012 e 2013, foram utilizadas 288 armadilhas, sendo 144 do tipo Sherman (69 armadilhas no ano de 2012 e 75 em 2013) e 144 do tipo gaiola.



Figura 5: Distrito de Barra do Guaicui, MG, evidenciando as áreas de coleta, onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos (pontos brancos) e de pequenos mamíferos (linhas vermelhas) no ano de 2013 e 2014.

As armadilhas ficaram expostas durante quatro dias e noites seguidos, sendo que a cada manhã eram retirados os animais porventura coletados. Como isca alimentar foram utilizados abacaxi e chumaço de algodão embebido com solução de óleo de fígado de bacalhau para atração dos pequenos mamíferos, sendo realizada a troca das iscas em dias alternados. As estações de coleta foram estabelecidas de modo a amostrar os diferentes ambientes relacionados aos padrões de atividade humana.

4.3.3 Identificação e coleta das amostras biológicas de pequenos mamíferos

Os exemplares de pequenos mamíferos coletados foram sedados com acepromazina (Assepram 0,05 mg/Kg de peso) e posteriormente eutanasiados utilizando-se barbitúricos, para posterior retirada de amostras de pele de cauda, pele de orelha, fígado, baço e medula óssea.

A identificação das espécies coletadas foi realizada utilizando-se a literatura específica (Fonseca et al. 1996, Eisenberg & Redford, 1999) analisando-se os caracteres morfológicos, comparando os indivíduos coletados com exemplares referência depositados na Coleção de Mastozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4 Métodos moleculares para o estudo de *Leishmania* nos flebotomíneos e nos pequenos mamíferos.

4.4.1 Extração do DNA

As fêmeas de flebotomíneos coletadas, que não apresentavam sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen, foram identificadas e separadas individualmente para detecção de DNA de *Leishmania*.

Após a eutanásia dos pequenos mamíferos foram coletadas amostras de pele da orelha, da ponta da cauda, fígado, baço e medula óssea para a realização de estudos moleculares visando à caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. As amostras biológicas após serem coletadas foram acondicionadas em micro tubos com de RNAlater® (Ambion) e submetidas à extração do DNA.

Os flebotomíneos e os tecidos coletados dos pequenos mamíferos foram macerados em 150 µL de tampão NET10, 20 µL SDS 10% e 1 µL de proteinase K (20mg/mL) em tubos de 1,5 mL, vortexados por 10 segundos e incubados "overnight" a 56 °C sob agitação. Após a incubação foi dado um pulso na centrífuga para baixar o conteúdo suspenso nas paredes do tubo, acrescido 250 µL de fenol/clorofórmio e misturado 10 vezes por inversão. Após centrifugação por 6 minutos a 20 000 g, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, contendo 250 µL de clorofórmio/álcool isoamílico e misturado 10 vezes por inversão. Foi realizada outra centrifugação por 6 minutos a 20 000 g. A fase aquosa foi transferida para outro tubo de 1,5 mL contendo 400 µL de etanol absoluto e 15 µL de acetato de sódio 3M e misturado 10 vezes por inversão. Após incubação de 20 minutos a -70 °C o conteúdo foi novamente centrifugado por 6 minutos a 20.000 g. O sobrenadante foi descartado e no mesmo tubo foi acrescentado 500 µL de etanol a 70% e misturado 10 vezes por inversão, seguido de outra

centrifugação por 6 minutos a 20.000 g. Por fim o sobrenadante foi descartado, o tubo seco por exposição ao ambiente e o DNA eluído em 50 µL de água.

4.4.2 Nested PCR (LnPCR) para o gene SSUrRNA de *Leishmania* em amostras de DNA extraídas de flebotomíneos e pequenos mamíferos

A LnPCR – SSUrRNA amplifica um fragmento do gene SSUrRNA que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania*. Esta técnica é utilizada para a detecção direta, sem a necessidade de isolamento do parasito, a partir de diferentes amostras biológicas (Van Eys et al., 1992; Cruz et al., 2002 e 2006). Tal metodologia, adaptada e modificada por Cruz et al. (2002), permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG C CG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µL contendo 10µL de DNA da amostra a ser testada, 5 µL da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 1 µL de dNTPs a 10mM, 1µL do iniciador R1 a 15µM, 1 µL do iniciador R2 a 15µM, 1,4 µL de Tth DNA polimerase a 1U/ µL (Biotools) e 30,6 µl de H₂O destilada estéril. Em tubos contendo 1 mL de H₂O foram diluídos 25 µL de produto da primeira reação, para serem utilizados como "template" da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µL contendo 10µL do produto amplificado diluído, 2,5 µL da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 0,5 µL de

dNTPs a 10mM, 0,5µL do iniciador R3 a 15µM, 0,25 µL do iniciador R4 a 15µM, 0,7 µL de Tth DNA polimerase a 1U/ µL (Biotools) e 10,55 µL de H₂O destilada estéril. As amplificações foram processadas em aparelho termociclador automático (AB9800®) utilizando os seguintes ciclos: 1ª reação - desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, 2ª reação - desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi a 72 °C por cinco minutos para ambas as reações.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), e como branco da reação foi utilizada água destilada estéril. Nas reações com DNA extraído dos flebotomíneos além dos controles positivos de *Leishmania* foram utilizadas amostras de DNA de fêmeas de *Lu. longipalpis*, obtidas de colônia de criação e não infectadas, como controle para verificar a possível amplificação com os iniciadores utilizados.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), com o PM de 100 pb, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram bandas de peso molecular correspondente ao esperado, 603 pb e 353 pb, na primeira e na segunda reação respectivamente.

4.4.3 PCR dirigida ao gene hsp70 de *Leishmania* em amostras de DNA extraídas de pequenos mamíferos

Os genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70kD de *Leishmania* (hsp70) são arranjados in tandem, compreendendo uma família de genes cujas sequências codificadoras em diferentes organismos são altamente conservadas (Folgueira et al., 2007).

Utilizando os iniciadores HSP70 for: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 rev: 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3', foi gerado um fragmento de 1300pb (Garcia et al., 2004). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 5µL de amostra de DNA, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix (Promega), 5,0% DMSO (Invitrogen), 5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 10 pmol de iniciador HSP70 for, e 10 pmol de iniciador HSP70 rev. (IDT, prodimol). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Veriti – Applied Biosystems) alternando 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 61 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 3 min, seguidos por um passo de extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos amplificados nesta PCR foram visualizados em exposição à luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

4.4.4 Identificação da espécie de *Leishmania*

A identificação das espécies de *Leishmania*, até complexo, presentes nos flebotômíneos foi realizada pelo seqüenciamento do produto amplificado da segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353pb) realizado na Coréia pela Macrogen.

As amostras seqüenciadas 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 antisenso, em tubos separados, 1µL de 5x Sequencing Buffer, 1µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e água destilada em quantidade suficiente para 10 µL empregando o programa que alterna 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 65 °C por 15 segundos. As seqüências foram determinadas pelo seqüenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer e analisadas por meio dos softwares Finch TV (Geospiza, Inc.), Sequence Scanner v 1.0 (Applied Biosystems). Por fim, o BLAST foi utilizado para o alinhamento das seqüências obtidas com as seqüências do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Para a identificação da espécie de *Leishmania* presente nos pequenos mamíferos as amostras que apresentaram a banda específica de 1300 pb na PCR dirigida ao gene *hsp70* foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de *HaeIII* (New England) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima

e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37 °C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.5 Análise Estatística

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2003).

O diferente número de trilhas em cada área refletiu em um esforço amostral diferente. Esse esforço foi calculado multiplicando o número total de armadilhas em uma área pelo número de dias que as armadilhas estiveram expostas. O esforço amostral foi utilizado para calcular outro índice, o sucesso de captura, o qual indica a eficiência real de um tipo de armadilha em uma área. O sucesso de captura foi calculado utilizando o número total de indivíduos coletado dividido pelo esforço amostral.

Para a avaliação das espécies mais abundantes, em cada área, o Index of Species Abundance (ISA) foi convertido em uma escala de zero a um, pelo Standardized Index of Species Abundance (SISA). Neste índice, o valor um corresponde às espécies mais abundantes (Roberts e Hsi 1979). Considerou-se riqueza o número total de espécies e abundância o número total de indivíduos coletados. A diversidade e uniformidade das espécies de flebotomíneos nas diferentes áreas foram estimadas pela utilização do índice

de diversidade de Shannon-Wiener (H') e equabilidade (ou uniformidade) de Pielou (J) (Hayek e Buzas 1997). O índice de Shannon (H') e a equabilidade de Pielou (J) são muito utilizados para avaliar a diversidade e a dominância ecológica de espécies. Quanto maior o valor de H' , maior é a diversidade. Já o índice de equabilidade (J) pertence ao intervalo 0 a 1, onde 1 representa a máxima diversidade, ou seja, todas as espécies são igualmente abundantes apresentando o mesmo número de indivíduos, o que significaria ausência de dominância ecológica. Para as espécies mais prevalentes deste estudo, foram comparadas ainda as abundâncias de cada espécie entre as áreas, por meio de Análise de Variância (ANOVA).

5 RESULTADOS

5.1 Estudo dos Flebotomíneos

5.1.1 Coletas com armadilhas luminosas automáticas

Os resultados apresentados são relativos às coletas realizadas nos meses de março, junho, julho, setembro e outubro de 2012 e ao período de um ano de março de 2013 a fevereiro de 2014 no distrito de Barra do Guaicui, Minas Gerais.

De um total de 5.831 espécimes de flebotomíneos, foram identificadas quinze espécies pertencentes a oito gêneros: *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia* e *Sciopemyia*. O número de flebotomíneos coletados por espécie e sexo é apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Espécies de flebotomíneos e número de machos e fêmeas coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, nos meses de março, junho, julho, setembro, outubro de 2012 e no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

Espécies	N° de flebotomíneos coletados		
	Machos	Fêmeas	Total
<i>Brumptomyia avellari</i>	198	133	331
<i>Evandromyia evandroi</i>	58	329	387
<i>Evandromyia lenti</i>	495	110	605
<i>Evandromyia sallesi</i>	77	171	248
<i>Evandromyia termitophila</i>	8	33	41
<i>Evandromyia walkeri</i>	21	11	32
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	809	171	980
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	19	17	36
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1420	1289	2709
<i>Nyssomyia neivai</i>	257	175	432
<i>Nyssomyia whitmani</i>	3	2	5
<i>Pintomyia pessoai</i>	0	2	2
<i>Psathyromyia lutziana</i>	4	3	7
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	3	4	7
<i>Sciopemyia sordellii</i>	6	3	9
Total	3378	2453	5831

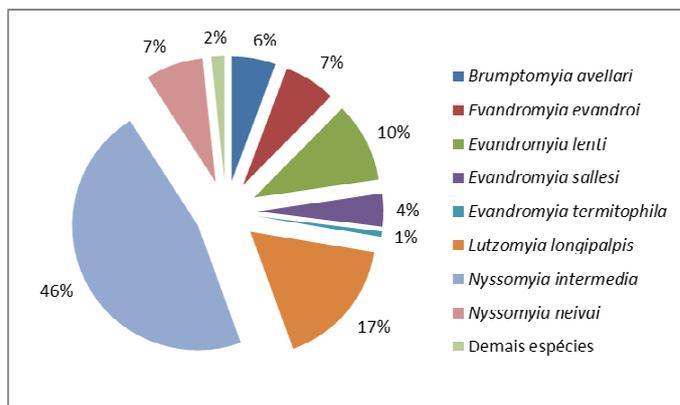


Figura 6: Percentual por espécie de flebotomíneos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, durante os meses de estudo nos anos 2012, 2013 e 2014.

Conforme apresentado na figura 6, a espécie *Ny. intermedia* correspondeu a 46% do total de flebotomíneos coletados na área de estudo, seguida de *Lu. longipalpis* com 17%. Estas espécies também apresentaram a maior densidade populacional nos dois anos de coleta, seguida das espécies *Ny. neivai*, para o ano de 2012, e *Ev. lenti* e *Ev. evandroi* para o segundo período de estudo (Figura 7).

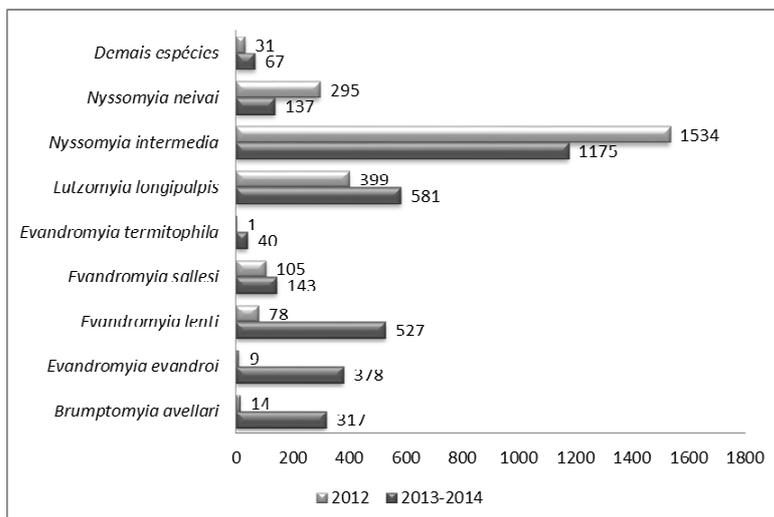


Figura 7: Total de flebotomíneos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, de acordo com a espécie e o ano de coleta.

A tabela 4 apresenta a distribuição de flebotomíneos segundo o mês de coleta na área urbana do distrito de Barra do Guaicui referente ao ano de 2012. O maior número de flebotomíneos foi observado no mês de junho (44,16%) e as espécies mais abundantes, no peridomicílio das casas, foram *Ny. intermedia* (62%), *Lu. longipalpis* (16%) e *Ny. neivai* (12%) (Figura 8).

Tabela 4: Número e porcentagem de flebotomíneos coletados, de acordo com a espécie e sexo na área urbana do Distrito de Barra do Guaiçui, MG, nos meses de março, junho, julho, setembro e outubro de 2012.

Espécies coletadas	Total de espécies coletadas por mês e porcentagem com relação ao total coletado (N/%)										Total
	Março		Junho		Julho		Setembro		Outubro		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Brumptomyia avellari</i>	1 (0,04)	2 (0,08)	2 (0,08)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	1 (0,04)	1 (0,04)	1 (0,04)	5 (0,20)	14 (0,57)
<i>Evandromyia evandroi</i>	0 (0)	4 (0,16)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,08)	1 (0,04)	1 (0,04)	9 (0,36)
<i>Evandromyia lenti</i>	4 (0,16)	2 (0,08)	19 (0,77)	4 (0,16)	7 (0,28)	2 (0,08)	23 (0,93)	6 (0,24)	1 (0,04)	10 (0,41)	78 (3,16)
<i>Evandromyia sallesi</i>	1 (0,04)	19 (0,77)	10 (0,41)	13 (0,53)	0 (0)	3 (0,12)	12 (0,49)	18 (0,73)	9 (0,36)	20 (0,81)	105 (4,26)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	1 (0,04)
<i>Evandromyia walkerii</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	2 (0,08)	4 (0,16)	0 (0)	4 (0,16)	2 (0,08)	13 (0,53)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	86 (3,49)	22 (0,89)	178 (7,22)	24 (0,97)	33 (1,34)	7 (0,28)	28 (1,14)	4 (0,16)	9 (0,36)	8 (0,32)	399 (16,18)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2 (0,08)	2 (0,08)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	5 (0,20)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	154 (6,24)	138 (5,60)	446 (18,09)	258 (10,46)	114 (4,62)	129 (5,23)	120 (4,87)	91 (3,69)	24 (0,97)	60 (2,43)	1.534 (62,21)
<i>Nyssomyia neivai</i>	30 (1,22)	33 (1,34)	87 (3,53)	42 (1,70)	17 (0,69)	10 (0,41)	34 (1,38)	20 (0,81)	6 (0,24)	16 (0,64)	295 (11,96)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1 (0,04)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0,16)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1 (0,04)	1 (0,04)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0,12)
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,04)	3 (0,12)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0 (0)	1 (0,04)	1 (0,04)	1 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0,12)
Total	280 (11,35)	225 (9,12)	746 (30,25)	343 (13,91)	173 (7,02)	154 (6,24)	223 (9,04)	143 (5,80)	56 (2,27)	123 (4,99)	2.466 (100)

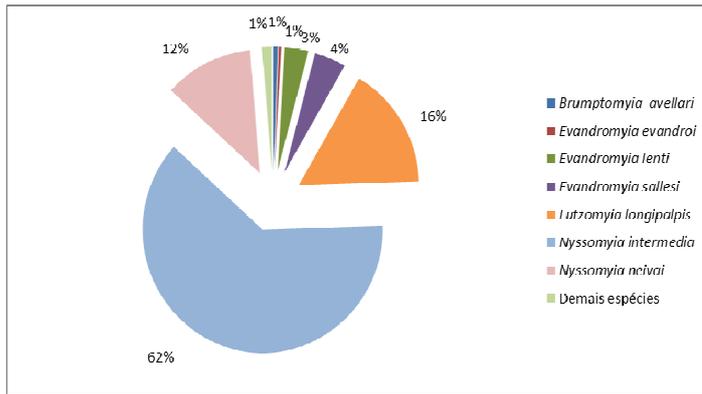


Figura 8: Percentual de flebotomíneos por espécie, coletados nos meses de março, junho, julho, setembro, outubro de 2012 na área urbana do distrito de Barra do Guaicui, MG.

5.1.2 Distribuição, riqueza e abundância da fauna flebotomínica nos ambientes urbano, de transição e silvestre.

Para o período de março de 2013 a fevereiro de 2014 as coletas foram conduzidas em três ambientes distintos: área urbana (peridomicílio das casas), área de transição e área de mata. Foi possível observar o maior número de espécimes de flebotomíneos coletados nos meses de março e novembro com 15,57% e 15,04% do total, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Número mensal de flebotomíneos coletados com armadilha luminosa HP, segundo mês, local de coleta e sexo no distrito de Barra do Guaicui, MG, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

Ano	Mês	Áreas de estudo						Total	
		Urbana		Transição		Mata		N	%
		♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2013	Mar	143	65	10	18	169	119	524	15.57
	Abr	95	126	13	11	65	46	356	10.58
	Mai	182	76	1	1	88	95	443	13.16
	Jun	119	54	2	16	58	50	299	8.89
	Jul	24	22	1	4	9	11	71	2.11
	Ago	74	83	1	0	0	0	158	4.70
	Set	58	61	1	2	1	1	124	3.68
	Out	38	127	16	21	19	25	246	7.31
	Nov	184	89	22	20	119	72	506	15.04
	Dez	77	19	4	4	25	46	175	5.20
2014	Jan	61	70	8	8	56	28	231	6.86
	Fev	109	56	34	8	14	11	232	6.89
Total		1.164	848	113	113	623	504	3.365	100.00

As coletas mensais, referentes ao período de março de 2013 a fevereiro de 2014, renderam 3.365 espécimes de flebotomíneos, sendo 1.900 machos (56,5%) e 1.465 fêmeas (43,5%). A Tabela 6 mostra o número total de flebotomíneos coletados por espécie e área de estudo, bem como o índice de diversidade de Shannon (H) e a uniformidade de Pielou (J).

A área urbana foi responsável pelo maior número de flebotomíneos coletados com 2.012 (59,8%) indivíduos, seguida da área de mata, com 1.127 (33,5%), e por último a área de transição, com 226 (6,7%) indivíduos. Como o número de pontos amostrados foi diferente entre as áreas, isso resultou em um diferente esforço de captura. Nas áreas urbana e de transição, o esforço foi de 72 armadilhas/noite, enquanto na área de mata esse esforço foi de 216

armadilhas/noite. Assim, o sucesso de captura foi maior na área urbana (27.94), seguido da área de mata (5.22), e por último a área de transição (3.14).

A riqueza foi aproximadamente igual em todas as áreas. Na área silvestre foram coletadas 14 espécies, já as áreas urbana e de transição foram representadas por 13 espécies de flebotomíneos. A área de transição apresentou a maior diversidade e valores de uniformidade, 1,869 e 0,728, respectivamente, e a área urbana apresentou os mais baixos índices de diversidade e uniformidade, 1,282 e 0,499, respectivamente (Tabela 6).

A espécie *Ny. whitmani* foi encontrada com exclusividade na área de transição enquanto *Micropygomyia quinquefer* e *Psathyromyia bigeniculata* só não foram coletadas nesta localidade. *Pintomyia pessoai* foi coletada apenas nas áreas de transição e silvestre.

Tabela 6: Espécies de flebotomíneos coletados no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, por área de estudo e sexo, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014, e seus respectivos índices de diversidade (H) e uniformidade (J).

Categoria taxonômica	Área urbana		Área de transição		Área de mata								Total (%)
	A		T1		T2		T3		T4				
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M			
<i>Brumptomyia avellari</i>	13	15	33	25	48	102	9	10	22	40	317 (9.42)		
<i>Evandromyia evandroi</i>	6	8	49	9	141	19	29	4	97	16	378 (11.23)		
<i>Evandromyia lenti</i>	16	35	6	36	27	195	9	35	28	140	527 (15.66)		
<i>Evandromyia sallesi</i>	52	27	5	0	15	1	12	12	14	5	143 (4.25)		
<i>Evandromyia termitophila</i>	1	3	2	0	12	3	4	0	14	1	40 (1.19)		
<i>Evandromyia walkeri</i>	2	8	0	2	2	2	1	0	1	1	19 (0.56)		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	101	435	2	19	1	12	0	4	2	5	581 (17.27)		
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	14	16	0	0	0	0	0	0	0	1	31 (0.92)		
<i>Nyssomyia intermedia</i>	589	539	10	17	1	4	4	2	9	0	1.175 (34.92)		
<i>Nyssomyia neivai</i>	52	76	2	3	0	2	0	1	0	1	137 (4.07)		
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.03)		
<i>Pintomya pessoai</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2 (0.06)		
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	4 (0.12)		
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	4 (0.12)		
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	0	0	2	0	2	0	1	0	0	6 (0.18)		
Total (%)	2.012 (59.79)		226 (6.72)		1.127 (33.49)						3.365 (100)		
Índice de diversidade (H)	1.2823		1.8694		1.5572						1.8529		
Índice de uniformidade (J)	0.4999		0.7288		0.5901						0.6842		

Considerando todas as áreas amostradas, a espécie mais abundante foi *Ny. intermedia* com 35% do total de flebotomíneos coletados, seguida de *Lu. longipalpis* (17%), *Ev. lenti* (16%), *Ev.evandroi* (11%), *Br. avellari* (9%) e *Ny. neivai* e *Ev.sallesi* ambas com 4% (Tabela 6).

Ao analisar estas sete espécies mais abundantes no estudo, utilizando a ANOVA, quatro (*Ev. sallesi*, *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*) apresentaram diferenças significativas na abundância entre as trilhas amostradas ($p < 0.001$), sendo mais abundantes na área urbana (trilha A) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) das principais espécies de flebotomíneos coletados nas trilhas da área urbana, de transição e silvestre no distrito de Barra do Guaicui, estado de Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

Espécie	Áreas de Estudo					F	p
	Urbana		Silvestre				
	A	T1	T2	T3	T4		
<i>Brumptomyia avellari</i>	28	58	150	19	62	0.761	0.5779
<i>Evandromyia evandroi</i>	14	58	160	33	113	2.088	0.0947
<i>Evandromyia lenti</i>	51	42	222	44	168	1.299	0.2817
<i>Evandromyia sallesi</i>	79 ^a	5 ^b	16 ^b	24 ^b	19 ^b	5.351	<0.001
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	536 ^a	21 ^b	13 ^b	4 ^b	7 ^b	11.05	<0.001
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1.128 ^a	27 ^b	5 ^b	6 ^b	9 ^b	47.9	<0.001
<i>Nyssomyia neivai</i>	128 ^a	5 ^b	2 ^b	1 ^b	1 ^b	17.29	<0.001

^{a,b}: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as colunas; $p < 0.001$

As três espécies que apresentaram forte diferença numérica, mas não apresentaram diferença estatisticamente significativa, tiveram uma distribuição bastante desigual no número de espécimes coletados ao longo do ano.

A grande diferença na abundância total de *Br. avellari* da trilha 2, quando comparada com as demais trilhas, pode ser explicada pelo grande número de espécimes coletados em um único mês. Somando os dados de todos os meses foi observado um total de 150 espécimes de *B. avellari* na trilha 2, sendo que apenas no mês de novembro foram capturados 133 espécimes (Figura 9).

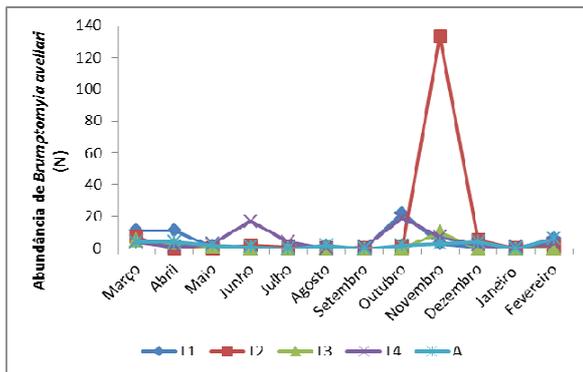


Figura 9: Número de espécimes de *Brumptomyia avellari* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaicui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

Para *Ev. evandroi* e *Ev. lenti* resultados semelhantes foram encontrados. Para a primeira espécie ocorreu um alto número de insetos coletados nos meses de março na trilha 4 e em maio na trilha 2 (Figura 10). Para a segunda

espécie, a maior abundância também foi observada no mês de março na trilha 4, e nos meses de maio e janeiro na trilha 2 (Figura 11).

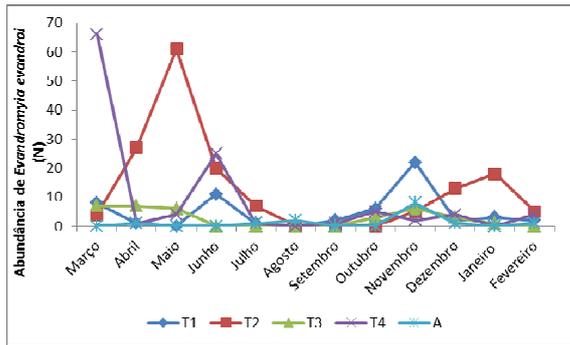


Figura 10: Número de espécimes de *Evandromyia evandroi* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaicui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

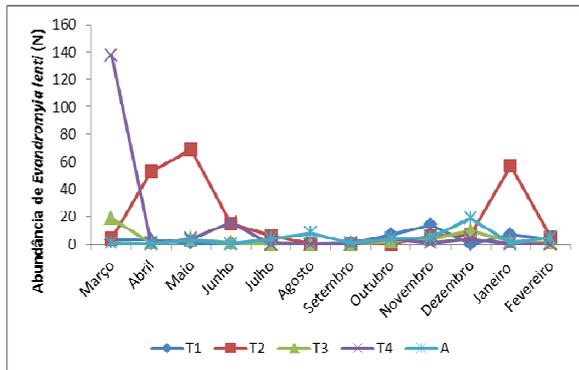


Figura 11: Número de espécimes de *Evandromyia lenti* coletados nas trilhas das áreas amostradas do distrito de Barra do Guaicui, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

O mesmo padrão foi observado na ANOVA quanto testado o número de espécimes coletados para cada uma das sete espécies, mais abundantes no estudo, entre os três ambientes amostrados (Tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) das sete espécies mais abundantes do estudo comparando o número de espécimes coletados por área de estudo.

Espécie	Áreas de Estudo			F	P
	Urbana	Transição	Silvestre		
<i>Brumptomyia avellari</i>	28	58	231 (77)	0.2463	0.782
<i>Evandromyia evandroi</i>	14	58	306 (102)	1.709	0.19
<i>Evandromyia lenti</i>	51	42	434 (144.67)	1.047	0.357
<i>Evandromyia sallesi</i>	79 ^a	5 ^b	59 (19.67) ^b	10.94	<0.001
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	536 ^a	21 ^b	24 (8) ^b	22.89	<0.001
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1.128 ^a	27 ^b	20 (6.67) ^b	99.29	<0.001
<i>Nyssomyia neivai</i>	128 ^a	5 ^b	4 (1.33) ^b	35.83	<0.001

^{a,b}: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as colunas; p<0.001
():abundância média das três trilhas da área silvestre.

Ao analisar a frequência de cada espécie, segundo local de coleta, se destacam na área urbana as espécies *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* e *Lu. longipalpis* com 96%, 93,4% e 92,3% respectivamente do total de espécimes encontrados neste ambiente. As espécies *Ev. lenti* (82,4%) e *Ev. evandroi* (81%) foram coletadas, principalmente, na área de mata. *Evandromyia sallesi* se mostrou bem distribuída entre as áreas urbana e de mata, enquanto a espécie mais representativa da área de transição foi *Br. avellari* (18,3%) (Figura 12).

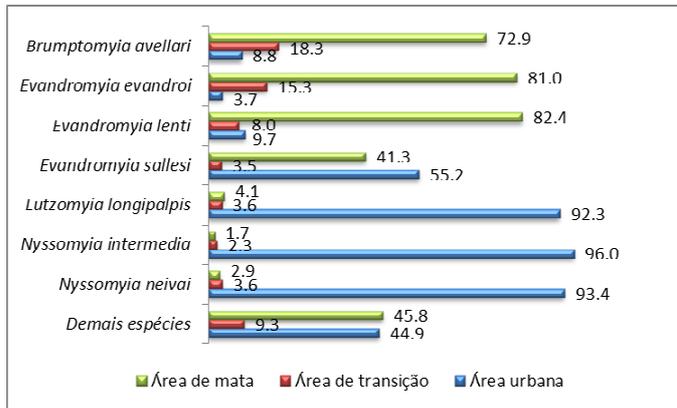


Figura 12: Gráfico representando a frequência das espécies de flebotomíneos coletadas de acordo com as áreas estudadas no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

A figura 13 apresenta o índice padronizado de abundância das espécies coletadas nos diferentes ambientes amostrados nos anos de 2013 e 2014. Na área urbana a espécie *Ny. intermedia* ocupa o primeiro lugar com SISA=1, seguida de *Lu. longipalpis* (SISA=0,50), *Ny. neivai* (0,40) e *Ev. sallesi* (0,38). Na área de transição destacam *Ev. evandroi* (0,75) seguida de *Br. avellari* (0,67) e *Ev. lenti* (0,50). Esta última espécie ocupou o primeiro lugar na área silvestre, com SISA=0,92, enquanto *Ev. evandroi* (SISA=0,61) foi a segunda espécie mais abundante nesta área. *Ny. intermedia*, *Lu. longipalpis* e *Ev. sallesi* se mostraram bem distribuídas entre as áreas de transição e silvestre com valores SISA bem próximos (Figura 13).

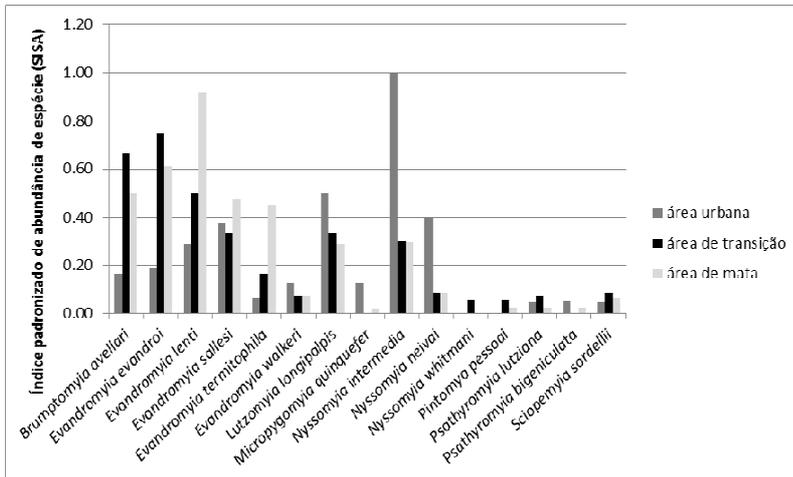


Figura 13: Índice padronizado de abundância das espécies coletadas, por área de estudo, utilizando armadilhas automáticas luminosas no distrito de Barra do Guaiçuí, Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

Levando em consideração os três ambientes amostrados, as espécies mais abundantes foram *Ev. lenti* com valor do SISA de 0.83, *Ev. evandroi* (0,81), *Br. avellari* (0,71), *Ny. intermedia* ocupa o quarto lugar com SISA=0,60, seguida de *Ev. sallesi* (0,58) e *Ev. termitophila* (0,52) (Figura 14).

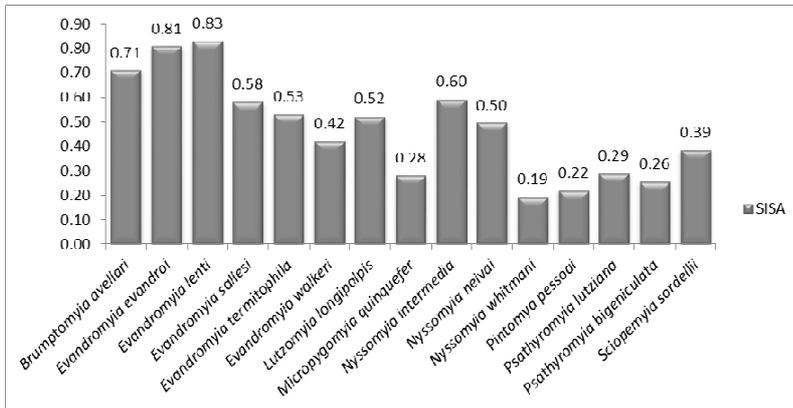


Figura 14: Índice padronizado de abundância das espécies coletadas utilizando armadilhas automáticas luminosas no distrito de Barra do Guaiçuí, estado de Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

5.1.3 Estudo da infecção natural e detecção de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos

Das 2.453 fêmeas coletadas aquelas que não apresentavam sangue no conteúdo intestinal (2.325/94,8%) foram submetidas individualmente à técnica de extração do DNA, e à pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando a Nested PCR (LnPCR) dirigida a uma região do gene SSUrRNA. As 128 (5,2%) fêmeas que apresentavam sangue no intestino foram montadas e identificadas.

Do total de fêmeas coletadas no ano de 2012 e que não apresentavam sangue no tubo digestório, 656 (66,4%) foram submetidas também à técnica da dissecação com o mesmo objetivo de verificar a presença de infecção natural

por *Leishmania*. Após a retirada do intestino, os mesmos foram analisados sob microscópio óptico e nenhuma forma flagelada foi visualizada.

Empregando a Nested PCR (LnPCR) dirigida a uma região do gene SSUrRNA de *Leishmania* foi possível verificar a presença do fragmento de 353 pb em 47 amostras das 2.325 analisadas. As amostras positivas foram provenientes de 16 espécimes pertencentes à espécie *Ny. intermedia*, dez de *Ev. evandroi*, seis de *Lu. longipalpis* cinco de *Ev. sallesi*, quatro *Ny. neivai*, três de *Ev. lenti*, e uma amostra positiva de cada uma das espécies *Ev. termitophila*, *Ev. walkeri* e *Pa. lutziana* (Figuras 15, 16, 17 e 18).

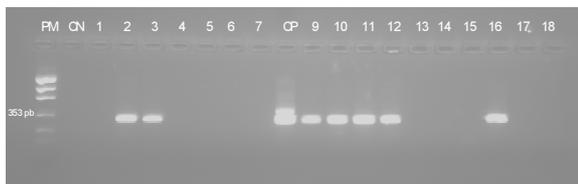


Figura 15: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados na LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletadas no distrito de Barra do Guaicuí, MG. Canaletas: PM – marcador molecular ØX174; CN – branco da reação; Amostras positivas: 2, 3, *Ev. evandroi*; 12, *Ev. sallesi*; 9, 10, 11, 16, *Ny. intermedia*; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*).

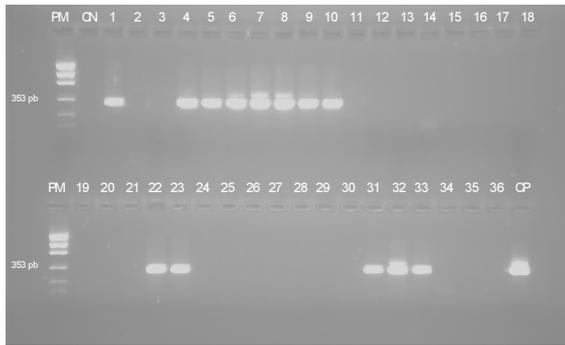


Figura 16: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados na LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletadas no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN – branco da reação; Amostras positivas: 10, *Ev. lenti*; 7, 22, 23, *Ev. sallesi*; 1, *Ev. walkeri*; 8, 5, *Lu. longipalpis*; 4, 6, 9, 31, *Ny.intermedia*; 32, 33, *Ny. neivai*; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*).



Figura 17: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados na LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletadas no distrito de Barra do Guaiçuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN – branco da reação; Amostras positivas: 5, 13, 14, 26, 29, *Ev. evandroi*; 27, *Ev. sallesi*; 18, *Lu. longipalpis*; 11, 12, 17, 31, *Ny. intermedia*; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*).

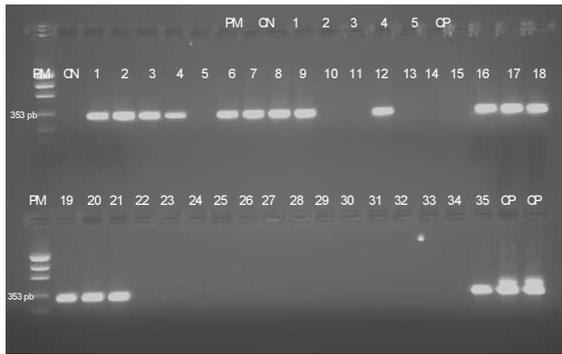


Figura 18: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados na LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletadas no distrito de Barra do Guaicuí, MG. Canaletas: PM - marcador molecular ØX174; CN – branco da reação; Amostras positivas: 4, 12, 20, *Ev. evandroi*; 9, 17, *Ev. lenti*; 18, *Ev. termitophila*; 19, 21, 35, *Lu. longipalpis*; 1, 6, 7, 16, *Ny. intermedia*; 2, 3, *Ny. neivai*; 8, *Pa lutziana*; CP - controle positivo (DNA de *Le. (V.) braziliensis*).

Para a identificação da espécie de *Leishmania* até complexo, utilizou-se a técnica do sequenciamento. Em 47 (100%) das amostras positivas, esta técnica permitiu identificar espécies pertencentes ao complexo *Le. donovani* e ao complexo *Le. braziliensis* nas fêmeas de flebotomíneos. Desta maneira, foram encontradas quatro amostras de *Ny. intermedia*, cinco de *Ev. evandroi*, duas das espécies *Ev. sallesi*, *Ev. lenti* e *Ev. neivai* e uma amostra de *Lu. longipalpis* e *Pa. lutziana* com a presença de DNA similar as das espécies do complexo *Le. donovani*. Para o complexo *Le. braziliensis* foram identificadas doze amostras de *Ny. intermedia*, cinco *Lu. longipalpis* e *Ev. evandroi*, três de

Ev. sallesi, duas de Ny. neivai e uma amostra das espécies Ev. lenti, Ev. walkeri e Ev. termitophila (Tabela 9).

A taxa de detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos para o distrito de Barra do Guaicuí, durante o período de estudo, foi de 2,0%. A maior parte das amostras encontradas positivas para a presença de DNA de *Leishmania* foi por espécies do complexo *Le. braziliensis* 63,8% (30/47), enquanto 36,2% (17/47) foram identificadas como pertencentes ao complexo *Le. donovani*.

Para a espécie *Ny. intermedia*, a taxa de positividade para espécies do complexo *Le. braziliensis* foi de 0,9% (12/1.289) e para *Lu. longipalpis* foi de 2,9% (5/171). O DNA de parasitos deste complexo também foi encontrado nas espécies *Ev. termitophila* 3,0% (1/33), *Ev. sallesi* 1,8% (3/171), *Ev. evandroi* 1,5% (5/329), *Ev. neivai* 1,1% (2/175), *Ev. lenti* 0,9% (1/110), e *Ev. walkeri* 9,09% (1/11).

Para o complexo *Le. donovani* as taxas de positividade nas fêmeas de flebotomíneos foram as seguintes: *Ny. intermedia* 0,3% (4/1.289), *Ev. evandroi* 1,5% (5/329), *Ev. lenti* 1,8% (2/110), *Ev. sallesi* 1,2% (2/171), *Lu. longipalpis* 0,58% (1/171), *Ny. neivai* 1,1% (2/175) e *Pa. lutziana* 33,33% (1/3). A tabela 9 apresenta os resultados da detecção de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos.

Tabela 9: Resultado da detecção de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses de março/junho/julho/setembro e outubro de 2012 e no período de março de 2013 a fevereiro de 2014 no distrito de Barra do Guaicui, MG.

Espécies	Nº de fêmeas coletadas	Amostras positivas	Complexo <i>Le. donovani</i>	Complexo <i>Le. braziliensis</i>
<i>Evandromyia evandroi</i>	329	10	5 ^{1,3}	5 ^{1,3}
<i>Evandromyia lenti</i>	110	3	2 ^{1,3}	1 ¹
<i>Evandromyia sallesi</i>	171	5	2 ¹	3 ¹
<i>Evandromyia termitophila</i>	33	1	0	1 ³
<i>Evandromyia walkeri</i>	11	1	0	1 ¹
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	171	6	1 ¹	5 ^{1,2}
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1289	16	4 ¹	12 ^{1,2}
<i>Nyssomyia neivai</i>	175	4	2 ^{1,2}	2 ¹
<i>Psathyromyia lutziana</i>	3	1	1 ²	0
Total	2292	47	17	30

¹ área urbana, ² área de transição e ³ área de mata

A figura 19 apresenta a distribuição das espécies de flebotomíneos encontradas com DNA de *Leishmania* segundo a localidade de estudo.

Nos três ambientes amostrados do Distrito de Barra do Guaicuí foram encontrados flebotomíneos com a DNA referente a espécies de *Leishmania*. A área urbana foi a que apresentou o maior número de amostras e a maior diversidade de espécies de flebotomíneos positivas. Das 47 amostras positivas para a presença de DNA de *Leishmania*, 34 (72,34%) eram provenientes da área urbana, 3 (6,38%) da área de transição e 10 (21,28%) da área de mata.

Amostras positivas de exemplares de *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* só não foram encontradas na área de mata. A área urbana foi responsável por 93,75% (15/16) das amostras positivas de *Ny. intermedia* e 83,33% (5/6) para *Lu. longipalpis*. Os outros espécimes de *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* foram provenientes da área de transição. As espécies *Ev. evandroi* e *Ev. lenti* foram encontradas positivas, para a presença de DNA de *Leishmania*, na área de mata (80% e 67%) e urbana (20% e 33%). As espécies *Ev. sallesi*, *Ev. walkeri* e *Ny. neivai* foram encontradas, exclusivamente, na área urbana, enquanto *Ev. termitophila* foi encontrada apenas na área de mata e *Pa. lutziana* na área de transição (Figura 19).

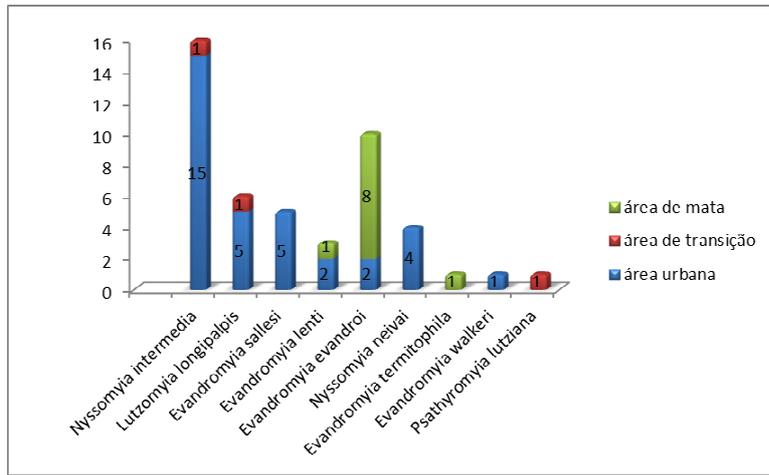


Figura 19: Total de flebotomíneos encontrados com a presença de DNA de *Leishmania* spp., segundo espécie e localidade de estudo, no Distrito de Barra do Guaiçuí, Minas Gerais.

5.2 Estudo dos pequenos mamíferos

5.2.1 Fauna dos pequenos mamíferos não voadores

A fauna de animais coletados no município de Várzea da Palma, distrito de Barra do Guaiçuí, compreendeu três espécies: *Didelphis albiventris*, *Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides*, totalizando 36 exemplares (Figura 20). As espécies *Didelphis albiventris* e *Thrichomys apereoides* apresentaram o maior número de espécimes coletados, 44,4% e 36,1%, respectivamente. Do total de animais coletados, 20 pertencem à ordem Rodentia e 16 à ordem Didelphimorphia (Tabela 10).



Figura 20: Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) coletados nos anos de 2012 e 2013 no distrito de Barra do Guaicui, MG. a: *Didelphis albiventris*; b: *Rattus rattus*; c: *Thrichomys apereoides*.

Tabela 10: Lista dos pequenos mamíferos coletados, por espécie, área de estudo e sexo, nos anos de 2012 e 2013, no Distrito de Barra do Guaicui, MG.

Espécies	Área de estudo						Total	
	Urbana		Transição		Mata		N	%
	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
Didelphimorphia								
<i>Didelphis albiventris</i>	0	2	6	7	1	0	16	44.4
Rodentia								
	<i>Rattus rattus</i>	5	2	0	0	0	0	7
<i>Thrichomys apereoides</i>	0	0	0	0	6	7	13	36.1
Total	5	4	6	7	7	7	36	100

A tabela 11 apresenta a distribuição das espécies coletadas em 2012, onde as coletas foram conduzidas na área urbana, plantação de cana, pastagem e as margens do Rio das Velhas. Apenas as espécies *D. albiventris* (75%) e *R. rattus* (25%) foram encontradas neste ano e todos os espécimes foram coletados no peridomicílio das casas da área urbana do distrito de Barra do Guaicuí. No mês de junho foi coletado um exemplar de cada espécie e em outubro dois exemplares de *D. albiventris* (Tabela 11).

Tabela 11: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos coletados no Distrito de Barra do Guaicuí, MG, nos meses de março, junho, agosto e outubro de 2012.

Ano	Meses	Espécies coletadas						Total	
		<i>Didelphis albiventris</i>		<i>Rattus rattus</i>		<i>Thrichomys apereoides</i>		(N)	(%)
		♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2012	Mar	0	0	0	0	0	0	0	0
	Jun	0	1	1	0	0	0	2	50.0
	Ago	0	0	0	0	0	0	0	0
	Out	0	2	0	0	0	0	2	50.0
Total		3		1		0		4	100

No ano de 2013 foi possível coletar espécimes das três espécies amostradas no estudo sendo a espécie *T. apereoides* (43,8%) a mais capturada seguida de *D. albiventris* (40,6%) e *R. rattus* (15,6%). Os meses de abril, maio e outubro foram responsáveis por 65,7% do total de animais coletados (Tabela 12). A espécie *T. apereoides* foi coletada exclusivamente em área de mata (100%), *R. rattus* exclusivamente em área urbana (100%) e 81,3% dos exemplares de *D. albiventris* foram encontrados em área de transição (Figura 21).

Tabela 12: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos coletados no Distrito de Barra do Guaicui, MG, no período de janeiro a dezembro de 2013.

Ano	Meses	Espécies coletadas						Total	
		<i>Didelphis albiventris</i>		<i>Rattus rattus</i>		<i>Thrichomys apereoides</i>		(N)	(%)
		♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2013	Jan	0	0	0	0	1	1	2	6.3
	Fev	0	1	0	0	2	1	4	12.5
	Mar	0	1	0	0	0	3	4	12.5
	Abr	2	1	3	2	0	0	8	25
	Mai	2	1	0	0	3	1	7	21.9
	Jun	0	0	0	0	0	0	0	0
	Jul	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ago	0	0	0	0	0	0	0	0
	Set	0	0	0	0	0	0	0	0
	Out	2	2	0	0	1	1	6	18.8
	Nov	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dez	1	0	0	0	0	0	1	3.1
Total		7	6	3	2	7	7	32	100

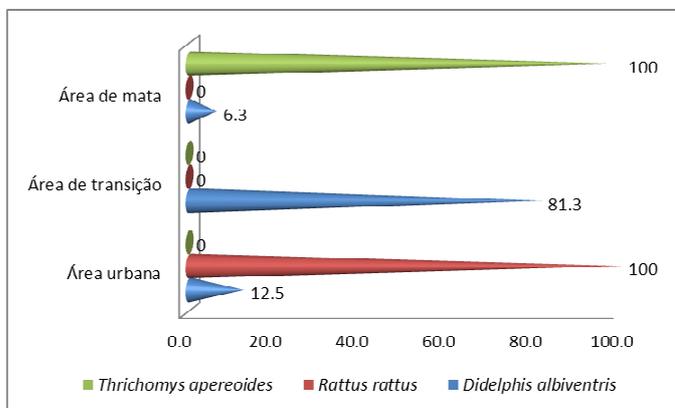


Figura 21: Porcentagem de pequenos mamíferos coletados, segundo área de estudo, no período de janeiro a dezembro de 2013 no distrito de Barra do Guaicui, MG.

5.2.2 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. nos roedores e marsupiais

Nas amostras de DNA extraídas dos pequenos mamíferos para a pesquisa de DNA de *Leishmania*, foram realizadas PCRs direcionadas a dois alvos, uma região do gene SSUrRNA (Nested PCR (LnPCR)) e e um fragmento do gene hsp70.

Foram testadas amostras de 25 espécimes de pequenos mamíferos. De cada um destes animais foram analisados tecidos da pele da orelha, pele da cauda, fígado, baço e medula óssea, totalizando 125 amostras para a realização do estudo. Os outros 11 animais não puderam ser incluídos nesta análise, pois eram fêmeas prenhas e/ou filhotes com idade inferior a seis meses de vida. Assim, estes animais após serem identificados foram soltos no mesmo momento e local de coleta. Todos os animais soltos pertenciam à espécie *D. albiventris* e foram capturados na área de transição.

Utilizando a Nested PCR nenhuma amostra foi positiva para a presença do DNA de *Leishmania*. Em contrapartida, duas amostras mostraram-se positivas na PCR dirigida ao gene hsp70. Os produtos amplificados destas amostras foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) (Figura 22).

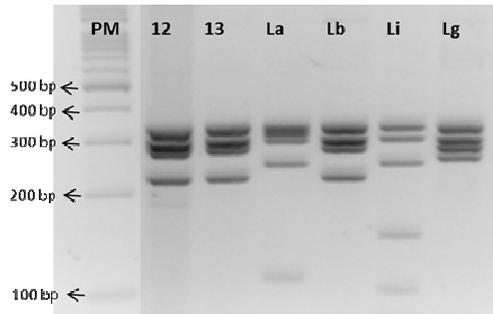


Figura 22: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* de fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos pequenos mamíferos. PM – 100pb, La – cepa padrão *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 12 e 13 – amostras de DNA provenientes de tecidos dos pequenos mamíferos de Barra do Guaiçuí - Várzea da Palma.

Os dois pequenos mamíferos coletados em Várzea da Palma e positivos na PCR *hsp70* foram coletados no ano de 2013. A RFLP das amostras positivas apresentou perfil na amostra de fígado de *T. apereoides* capturado na área de mata, e da amostra de pele de orelha de *D. albiventris* proveniente da área de transição (Tabela 13).

Tabela 13: Espécie de Leishmania identificada pela RFLP-hsp70 por espécie de pequeno mamífero, tecido amostrado e área de estudo no distrito de Barra do Guaicuí, Minas Gerais.

Espécie	Tecido				
	Medula	Baço	Fígado	Pele de cauda	Pele de orelha
<i>Trichomys apereoides</i>	-	-	<i>Le. braziliensis</i> ³	-	-
<i>Didelphis albiventris</i>	-	-	-	-	<i>Le. braziliensis</i> ²

² área de transição, ³ área de mata

A partir destes resultados ficou estabelecido uma taxa de infecção de 8% (2/25) para os pequenos mamíferos que foram coletados e analisados no distrito de Barra do Guaicuí, durante o período de estudo.

6 Discussão

6.1 Fauna flebotomínica

A fauna de flebotomíneos encontrada no distrito de Barra do Guaicui mostrou-se bem distribuída entre os ambientes amostrados e típica de ambientes modificados com a presença de florestas secundárias próximas como visto em outras áreas do Sudeste do Brasil (Brazil et al., 2006). Houve o predomínio de importantes espécies vetorais, como *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, espécies envolvidas na transmissão dos agentes causadores da LV e LT respectivamente (Rangel & Lainson, 2003; Andrade Filho et al., 2007). Além destas duas espécies merecem atenção *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Pa. bigeniculata*, espécies já encontradas infectadas naturalmente, sendo que algumas delas podem estar envolvidas no ciclo silvestre e/ou urbano das leishmanioses ou já foram incriminadas como vetorais em diversas regiões das Américas (Andrade Filho et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Saraiva et al., 2009; Margonari et al., 2010; Pech-May et al., 2010).

A presença de 15 espécies de flebotomíneos coletadas neste estudo vai de encontro aos achados no município de Várzea da Palma e na região norte do estado de Minas Gerais (Michalsky et al., 2005; Saraiva et al., 2008; Sanguinette, 2011; Rego et al., 2014). Registramos neste trabalho o primeiro encontro de *Pintomyia pessoai* para o município de Várzea da Palma, passando a fauna flebotomínica desta localidade a ser composta por 16 espécies.

A espécie que apresentou maior densidade populacional foi *Ny. intermedia*, seguida de *Lu. longipalpis*. Estes resultados contrapõem-se aos encontrados por outros autores em estudos entomológicos realizados no Norte do estado de Minas de Gerais, onde *Lu. longipalpis* foi apontada como a espécie predominante (Monteiro et al., 2005; Dias et al., 2007; Rego et al., 2014). Entretanto, em estudo realizado por Sanguinette (2011) no período de 2009 a 2010 no município de Várzea da Palma, 54% do total de flebotomíneos coletados foram pertencentes à espécie *Ny. intermedia*.

É conhecido que existe uma correlação entre a densidade de *Lu. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie é frequentemente associada a presença de animais domésticos (Forattini, 1960; Sherlock & Guitton, 1969). Esta característica comportamental foi evidenciada neste estudo, uma vez que houve um maior número de insetos desta espécie nas coletas realizadas no peridomicílio das casas na área urbana, locais onde havia a presença de criação de animais. A espécie *Lu. longipalpis* é amplamente distribuída no país, sendo encontrada em alta densidade nas regiões da caatinga e do cerrado, onde é frequentemente coletada em áreas peridomiciliares de regiões rurais e urbanas (Brasil, 2006; Rangel e Vilela, 2008; Carvalho et al., 2013).

A espécie *Ny. intermedia* é considerada de grande importância na transmissão de *Leishmania braziliensis* no Sudeste do Brasil (Marcondes et al., 1997; Andrade Filho et al., 2007). Em Minas Gerais *Ny. intermedia* é bastante abundante em áreas de ocorrência da LT. Gontijo et al. (2002) em trabalho realizado em um surto de LT no Vale do Jequitinhonha, descreveram a

prevalência de *Ny. intermedia* na região, bem como sua preferência por ambientes com maior grau de modificação antrópica. De acordo com a alta densidade populacional encontrada no distrito de Barra do Guaicuí, esta espécie pode estar participando do ciclo de transmissão das espécies de *Leishmania* causadoras das leishmanioses, juntamente com a espécie *Lu. longipalpis*.

Em um ano de coleta de flebotomíneos, março de 2013 a fevereiro de 2014, foi possível analisar a distribuição, riqueza e abundância de espécies em três ecótopos diferentes. A distribuição das espécies coletadas apresentaram perfis distintos entre eles, com destaque para o potencial risco de transmissão no ambiente urbano, onde foi observada a maior densidade populacional e abundância de importantes espécies vetoras de *Leishmania*.

Quando se compara o número de espécimes em cada ambiente (urbano, transição e silvestre), podemos notar um maior sucesso de captura de insetos no ambiente antrópico (27.94), quando comparada com a área silvestre (5.22) e de transição (3.14). Em contrapartida, o oposto ocorreu com a área de transição apresentando a maior diversidade (Tabela 6), (H 1,8694), seguido pelo ambiente silvestre (H 1,5572) e por último a área urbana (H 1,2823). A mesma tendência foi observada para o índice de uniformidade, o que se manteve elevado em locais com maior diversidade de espécies, mas baixo na área residencial, onde *Ny. intermedia* apresentou predominância absoluta, influenciando os baixos valores deste índice.

Provavelmente, o fato de a área urbana apresentar algumas características rurais, como criação de animais e plantações, levou ao maior número de insetos coletados. Alguns autores destacam a relevância de um chiqueiro e galinheiro como locais de criação e manutenção da alta densidade de flebotomíneos no meio ambiente como um fator de risco (Galati et al., 2003; Oliveira et al., 2006; Alves et al., 2012). Entretanto, a área de transição está localizada entre o ambiente de mata e o ambiente antrópico, o que pode ter levado ao encontro de uma maior diversidade nesta área do distrito de Barra do Guaicuí.

A análise de abundância de espécie nas três áreas demonstrou predominância absoluta da espécie *Ny. intermedia* na área urbana, seguida por *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai* e *Ev. sallesi*. Na área de transição as quatro espécies mais abundantes foram *Ev. evandroi*, *Br. avellari*, *Ev. lenti* e *Ev. sallesi*. Para a área silvestre destacam *Ev. lenti*, *Ev. evandroi*, *Br. avellari* e *Ev. sallesi*. Galati et al (2010) também relatam o primeiro lugar no ranking SISA para a espécie *Ny. intermedia* na Província Espeleológica do Vale do Ribeira. As espécies coletadas nas áreas de transição e silvestre são melhores adaptadas a ambientes florestais (Gomes & Galati, 1989; Marcondes et al., 2001), diferentemente daquelas espécies que predominaram na área urbana, mais bem adaptadas a ambientes antrópicos ou borda de floresta (Gomes et al., 1980, 1983; Souza et al . 2001).

Assim, embora as áreas tenham a fauna flebotomínica muito semelhante, diferindo apenas por algumas espécies, apresentam situações completamente diferentes em relação à abundância de espécies incriminadas

ou suspeitas de serem vetores de *Leishmania*, como *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ev. sallesi* e *Lu. longipalpis*. Foi possível observar no município de Várzea da Palma o padrão de adaptação destas espécies ao peridomicílio e ao ambiente modificado. A predominância de algumas espécies no ambiente antrópico é um fator relevante para a ocorrência dos ciclos de transmissão das leishmanioses e já foi mencionado em outros estudos relativos à fauna de flebotomíneos (Gomes & Galati 1989; Mayo et al., 1998; Andrade Filho et al., 2001; Loiola et al., 2007).

Apesar de *Ny. whitmani* ter sido representada por apenas cinco espécimes no distrito de Barra do Guaicuí, este achado requer atenção especial devido à sua implicação na transmissão de *Leishmania* sendo esta espécie vetor confirmado de *Le. braziliensis* na região nordeste do Brasil (Queiroz et al., 1994; Rangel & Lainson 2003; Loiola et al., 2007), e suspeita de estar envolvida na veiculação de *Le. infantum* em Minas Gerais (Carvalho et al., 2008; Saraiva et al., 2010).

A análise global de nossos resultados ajuda a compreender o processo gradual de sinantropização das espécies de flebotomíneos encontradas no estado de Minas Gerais, demonstrando que o município de Várzea da Palma apresenta todas as características necessárias para a expansão das leishmanioses, visceral e tegumentar, apontando para necessidade urgente da implantação de medidas profiláticas adequadas a situação local.

6.2 Infecção natural e detecção do DNA do parasito nas fêmeas de flebotomíneos

O município de Várzea da Palma é considerado uma área endêmica para leishmaniose tegumentar e visceral. Estudos em áreas endêmicas são cruciais, pois tem sido observado o aumento da incidência da LV nestas áreas, principalmente quando estas são urbanizadas (Grimaldi-Jr & Tesh, 1993; Brandão-Filho & Shaw, 1994; Brandão-Filho et al., 1999; Gontijo & Melo, 2004; Dias et al., 2007).

Neste estudo foi utilizada para a detecção do DNA do parasito a técnica da dissecação e a Nested PCR dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania* (LnPCR) e, para a identificação da espécie, o sequenciamento do produto amplificado da segunda reação da LnPCR (Cruz et al., 2002).

A técnica da dissecação do tubo digestório das fêmeas dos flebotomíneos é uma importante ferramenta na detecção de protozoários, pois permite sua visualização. Entretanto, consome muito tempo na pesquisa pelo parasito, requerendo habilidade e prática, sendo dependente do número, estágio e localização dos parasitos no trato digestório do inseto. Além disto, para a confirmação da infecção por *Leishmania* dos casos positivos precisa ser feita a identificação do protozoário após o isolamento *in vitro* ou pela inoculação em animais de laboratório (Tesh & Modi 1984; Rodriguez et al. 1994; Carvalho et al., 2008). Apesar do número considerável de fêmeas amostradas (66,4%), para a realização desta técnica, nenhuma forma flagelada foi encontrada utilizando este método de verificação de infecção natural. Em uma região

endêmica para LT no estado da Bahia, Vexenat et al. (1986) não encontraram infecção natural em 1.832 fêmeas dissecadas. No Vale do Rio Doce, Mayrink et al. (1979) dissecaram 1.194 fêmeas entre os anos de 1975-76 e não encontraram nenhuma fêmea de flebotomíneo infectada por *Leishmania*.

Diante destas dificuldades, a PCR tem sido amplamente utilizada para fins de detecção de DNA destes protozoários por ser um método altamente sensível e específico na detecção e identificação de *Leishmania* sp. em amostras biológicas de hospedeiros, reservatórios e vetores (Weigle et al. 2002; Miranda et al., 2002; Michalsky et al. 2002; Pita-Pereira et al. 2005; Quaresma et al., 2011; Rego et al., 2015). Os métodos moleculares têm ajudado a identificar espécies suspeitas de atuarem como vetores eliminando o erro que pode ser gerado pela pesquisa do parasito por microscopia, quando se considera que flagelados presentes no interior do trato digestório do flebotomíneo possam indicar infecção por *Leishmania* (Perez et al., 1994; Rodríguez et al., 1999). Atualmente, a Nested PCR dirigida ao SSUrRNA seguida do sequenciamento tem se mostrado uma boa ferramenta para detectar e identificar, até complexos, espécies de *Leishmania* em flebotomíneos, cães, roedores, marsupiais e humanos (Marcelino et al., 2011; Sanguinette, 2011; Rego et al., 2015; Menezes et al., 2015; Lara-Silva et al., 2015; Ferreira et al., 2015). Neste trabalho foi feita a identificação até complexos, conforme a resolução da metodologia utilizada (Cruz et al., 2002).

Alguns exemplares de fêmeas de flebotomíneos coletadas nos anos de 2012, 2013 e 2014 foram encontradas positivas para a presença DNA de espécies de *Leishmania* pertencentes aos complexos *Le. braziliensis* e *Le.*

donovani, conferindo uma taxa de detecção de DNA de *Leishmania* spp. de 2,0% para o distrito de Barra do Guaiçuí. Esta taxa é considerada baixa na natureza, 0,2 a 2,0%, mesmo em áreas endêmicas (Miranda et al., 2002; Gontijo et al., 2005; Silva et al., 2007a; Michalsky et al., 2011). Nossos resultados estão de acordo com os achados da literatura e se assemelham aos resultados de Silva et al. (2008) onde foi registrado uma taxa de 1,9% e de Pita Pereira et al. (2005) que demonstrou uma taxa de 2,0% em estudos realizados no Rio de Janeiro.

Para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses em uma área endêmica é essencial o conhecimento das espécies de parasitos circulantes. Relatamos o encontro de DNA de *Leishmania* sp. de 3,5% para *Lu. longipalpis*, 1,2% para *Ny. intermedia*, 2,3% para *Ny. neivai* e 2,9% para a espécie *Ev. sallesi*. Além destas espécies foram encontradas positivas *Ev. lenti* (3/110), *Ev. evandroi* (10/329), *Ev. termitophila* (1/33), *Ev. walkeri* (1/11) e *Pa. lutziana* (1/3).

A espécie *Lu. longipalpis* foi encontrada com DNA de parasitos do complexo *Le. donovani* (taxa de infecção de 0,58%) na área urbana e do complexo *Le. braziliensis* (2,9%) tanto na área urbana quanto na área de transição. Comparando nossos achados com estudos utilizando técnicas moleculares em outras regiões brasileiras, a taxa de detecção de DNA por *Le. infantum* foi menor, se aproximando apenas da taxa de infecção de 0,71% observada no estado de Mato Grosso (Missawa et al., 2010). No estado do Mato Grosso do Sul, bem como no município de Janaúba, Minas Gerais, a taxa

de infecção por *Le. infantum* foi de 3,9% para esta mesma espécie de flebotomíneo (Paiva et al., 2006; Michalsky et al., 2011).

Desde estudos conduzidos no Ceará por Deane & Deane (1954), até os dias atuais é possível constatar a competência de *Lu. longipalpis* como vetor da *Le. infantum*. Amplamente distribuída pelo território brasileiro (Brasil, 2003), esta espécie é considerada o principal vetor de *Le. infantum* e encontra-se adaptada ao ambiente urbano (Jeronimo et al., 1994; Costa et al., 1995; Silva et al., 2001; Oliveira et al., 2006; Brazil, 2013). É sabido que no Brasil a única espécie do complexo *Le. donovani* registrada é a *Le. infantum*. Portanto, a presença de DNA de parasito do complexo *Le. donovani* nesta espécie de flebotomíneo, indica o potencial de risco de transmissão de *Le. infantum* e a ocorrência da doença na região.

Foi encontrado no estudo, três espécimes de *Lu. longipalpis* com o DNA de parasitos do complexo *Le. braziliensis*. Em Minas Gerais, Lara-Silva et al. (2015) e Rego et al. (2015), utilizando a mesma técnica, descreveram para *Lu. longipalpis* a presença de DNA de *Le. braziliensis* e de espécies do subgênero *Viannia*, respectivamente. No estado do Mato Grosso do Sul, a presença do DNA de *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* foi detectada nesta mesma espécie de flebotomíneo (Paiva et al., 2006; Paiva et al., 2010). Savani et al. (2009) encontraram o DNA de *Le. infantum*, *Le. amazonensis* e *Le. (V.) sp.* em *Lu. longipalpis* neste mesmo estado.

Evidências epidemiológicas ao longo dos anos e a distribuição coincidente com a doença humana têm sugerido a espécie *Ny. intermedia*

como o principal transmissor do agente etiológico da LT no sudeste do Brasil (Forattini & Santos, 1952; Forattini et al., 1972, 1976; Araujo-Filho et al., 1979; Gomes et al., 1986; Rangel et al., 1986, 1990; Casanova et al., 1995; Córdoba-Lanus et al., 2006; Saraiva et al., 2009). Nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo esta espécie compartilha seu papel vetorial com *Ny. whitmani* (Mayrink et al., 1979; Falqueto, 1995). Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro foi possível coletar espécimes de *Ny. intermedia* alimentando diretamente em humanos, animais silvestres e domésticos em uma variedade de habitats, incluindo interior de residências, peridomicílio e área florestal localizada próxima as residências (Rangel et al., 1999).

O encontro de *Ny. intermedia* com a presença de DNA de parasitos pertencentes aos complexos *Le. braziliensis* e *Le. donovani* no distrito de Barra do Guaiçui, complementa os achados em estudo realizado nos anos de 2009 a 2011 no município de Várzea da Palma, onde foi observado a detecção de DNA de 0,98%, sendo todos os parasitos identificados como *Le. infantum* (Sanguinette, 2011). A observação de *Ny. intermedia* com DNA de *Le. infantum* foi descrita em um levantamento de fauna flebotomínica realizada na cidade de Belo Horizonte e São João das Missões no estado de Minas Gerais (Saraiva et al., 2010; Rego et al., 2015). Nesta última localidade, assim como nesta investigação, os espécimes eram provenientes do peridomicílio das casas amostradas.

Em um foco de LV no estado de Goiás não foi possível coletar *Lu. longipalpis*, a principal espécie vetora de *Le. infantum* no Brasil, e os flebotomíneos mais frequentemente coletados foram *Ny. intermedia*, *Ny.*

whitmani, *Pa. shannoni* s.l e *Psychodopygus davisi* (Coelho et al., 1965). Oliveira et al. (1959), em uma investigação realizada em Minas Gerais, onde havia alta incidência de LV e ausência de Lu. longipalpis, suspeitou que a transmissão pudesse estar ocorrendo pelas espécies *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. O papel de *Ny. intermedia* na transmissão do parasito causador da LV ainda não foi esclarecido. Entretanto, já foi demonstrada a capacidade desta espécie ser infectada experimentalmente por *Le. infantum* (Chagas, 1940; Paraense & Chagas, 1940), e sua inclusão, juntamente com *Ny. whitmani*, como alternativa de vetores de *Le. infantum* foi sugerida por Lainson e Rangel (2005).

Assim como *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, as espécies *Ev. sallesi*, *Ev. lenti*, *Ev. evandroi* e *Ny. neivai* também foram encontradas com DNA de parasitos dos complexos *Le. braziliensis* e *Le. donovani*. Este fato demonstra a circulação destes parasitos na área estudada. Apesar da presença do DNA de *Leishmania* na fêmea de flebotomíneo não ser suficiente para incriminar uma espécie como vetora, é uma condição que deve ser considerada, juntamente com o fato da espécie ser antropofílica, na definição do risco de transmissão para o homem e outros hospedeiros que possam atuar como reservatórios de *Leishmania* na natureza. Estes achados contribuem para um melhor entendimento da epidemiologia das leishmanioses em áreas endêmicas.

A aplicação de metodologias baseadas na PCR tem demonstrado com frequência relatos de agentes etiológicos de LT em vetores de agentes etiológicos da LV, e o mesmo tem ocorrido para os agentes de LV, sendo encontrados em vetores de agentes etiológicos da LT (Paiva et al., 2010).

Ressaltamos que estes insetos provavelmente alimentaram-se em hospedeiros susceptíveis infectados mas isso necessariamente não significa que elas sejam capazes de transmitir o parasito aos seres humanos e outros hospedeiros.

Outro fator relevante nestes achados é o fato da espécie *Ev. sallesi* fazer parte do complexo *cortelezzii*, o qual apresenta espécies com potencial como vetores em Minas Gerais, e ter sido descoberto infectado naturalmente por tripanosomatídeos e por *Le. infantum* neste mesmo estado (Mayrink et al., 1979; Saraiva et al., 2009; Sanguinette, 2011). A detecção de DNA de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* neste complexo foi relatada anteriormente em Lassance (Saraiva et al., 2009) e na região metropolitana de Belo Horizonte (Carvalho et al., 2008). Esta espécie de flebotomíneo não é considerada antropolifílica (Carvalho et al., 2009), entretanto pode estar participando do ciclo silvestre ou rural da transmissão entre outros hospedeiros vertebrados.

Evandromyia lenti foi à espécie mais abundante (SISA) neste estudo, sendo mais prevalente na área de mata. Há evidências de *Ev. lenti* ser uma espécie "semi-doméstica, com criadouros próximos das habitações humanas, sendo encontrada pela manhã repousando dentro de domicílios e em galinheiros (Sherlock, 1957). No Mato Grosso do Sul *Ev. lenti* se encontra associada a abrigos domésticos em zonas rurais (Galati et al., 1996) e em Campo Grande ao peridomicílio (Oliveira et al., 2003). Brazil et al., (1997) em estudo realizado sobre a biologia desta espécie utilizando uma população de Minas Gerais, observaram que a mesma não apresenta hábitos antropofílicos e é refratária ao desenvolvimento de *Leishmania* sp. Apesar deste fato, em

Jacobina (BA) onde foi verificado *Ev. lenti* picando o homem, cavalos e cães, esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por promastigotas. Nos últimos anos vêm sendo relatada a presença de DNA de *Le. braziliensis* (Xavier, 2007; Margonari et al., 2010; Paiva et al., 2010) e de *Le. infantum* (Sanguinette, 2011; Rego et al., 2015) nesta espécie, precisando ser melhor esclarecido o papel epidemiológico deste flebotomíneo, visto que foi encontrado DNA de *Leishmania* neste estudo tanto no peridomicílio quanto em área de mata.

Ainda sobre o gênero *Evandromyia*, a espécie *Ev. evandroi* foi a segunda mais abundante no distrito de Barra do Guaicui. Ximenes et al (2000) demonstraram que esta espécie é a segunda mais abundante no estado do Rio Grande do Norte, estando presente em áreas de LV e apresentando distribuição geográfica coincidente a da espécie *Lu. longipalpis*. Esta espécie foi considerada suspeita de transmitir *Le. infantum* para cães em Jacobina, estado da Bahia (Sherlock, 1996) e descoberta com DNA de *Le. infantum* em Várzea da Palma (Sanguinette, 2011). Relatamos o primeiro encontro de DNA de parasitos do complexo *Le. braziliensis* para a espécie *Ev. evandroi*.

A terceira espécie mais frequentemente coletada na área urbana foi *Ny. neivai*. Esta espécie ocorre em simpatria com *Ny. intermedia*, importante vetor de *Le. braziliensis* em algumas áreas de Minas Gerais, São Paulo e sul do Brasil (Andrade Filho et al., 2007). É mais comumente coletada em regiões do sul do Brasil e na Argentina onde foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* spp. (Córdoba-Lanús et al., 2006; Rangel e Lainson., 2009). Em estudo conduzido no município de Lassance, Minas Gerais, foi demonstrado

seu hábito antropofílico e sua infecção por *Le. infantum* (Saraiva et al., 2009). Esta espécie foi detectada com DNA de parasitos dos complexos *Le. braziliensis* e *Le. donovani* em nosso estudo, e a mais recente revisão sobre os vetores de *Leishmania* nas Américas, a menciona como transmissora do agente causador da forma cutânea da doença na América do Sul (Brazil et al., 2015).

Outras espécies de flebotomíneos foram encontradas com DNA de *Leishmania* sp. em Barra do Guaiçuí, entretanto não foi possível indicar sua importância epidemiológica no ciclo de transmissão das leishmanioses, levando em consideração os critérios definidos por Killick-Kendrick (1990) e Ready (2013). É o caso de *Ev. walkeri*, *Pa. lutziana* e *Ev. termitophila*, apesar desta última já ter sido encontrada com *Le. infantum* em Belo Horizonte (Saraiva et al., 2010) e *Le. braziliensis* em Várzea da Palma (Sanguinette, 2011),

6.3 Pequenos mamíferos e a infecção por *Le. braziliensis*

Nosso estudo foi o primeiro a produzir informações sobre a fauna de pequenos mamíferos do Distrito de Barra do Guaiçuí, e a ocorrência da infecção por *Le. braziliensis* nestes animais. Paglia et al. (2009) enfatizam a falta de informação científica de uma parcela considerável (20,5%) de pequenos mamíferos do Estado de Minas Gerais, e a necessidade de pesquisa para gerar informação sobre ecologia populacional e distribuição geográfica destes animais.

O levantamento da fauna de pequenos mamíferos no distrito de Barra do Guaicui, registrou a presença de três espécies, *Didelphis albiventris*, *Rattus rattus* e *Thricomys apereoides*, sendo a primeira pertencente a ordem *Didelphimorphia* e as duas últimas a ordem *Rodentia*.

A espécie *D. albiventris* é considerada sinantrópica, apresentando hábitos oportunistas vivendo em ambientes de florestas, em áreas urbanas e ambientes modificados pelo homem (Fonseca et al., 1982; Gardner, 2005; Carboncini et al., 2009). Foi possível verificar estas características neste estudo, uma vez que estes animais foram coletados nos três ambientes amostrados, urbano, transição e de mata. As duas espécies de roedores coletadas apresentam comportamentos distintos. *R. rattus* é considerada sinantrópica comensal possuindo uma distribuição cosmopolita, hábito terrestre, sendo encontrada predominantemente próxima a estabelecimentos humanos (Eisenberg & Redford, 1999) e a espécie de *T. apereoides* apresenta hábito cursório e semiarbórcola, preferencialmente crepuscular, e habita áreas abertas e florestais da caatinga, cerrado e pantanal (Oliveira et al., 2005). Esta última espécie de roedor é encontrada, principalmente, em ambientes rochosos onde constroem ninhos permanentes ou em plantações. Estas características comportamentais podem explicar o fato de indivíduos pertencentes à espécie *R. rattus* terem sido coletados com exclusividade na área urbana e *T. apereoides* na área de mata.

Fatores associados às alterações ambientais podem aumentar o contato do homem com os ciclos de transmissão de organismos causadores de doenças, permitindo o intercâmbio de parasitos entre animais silvestres,

domésticos e, conseqüentemente, o homem (Daszak et al., 2007; Jones et al., 2008; Swan, Coetzer & Terblanche, 2009). Este processo pode ser acelerado promovendo a dispersão dos parasitos para novas áreas e proporcionando o contato destes com novos hospedeiros, que poderão atuar como reservatório, aumentando a área de ocorrência da espécie de um determinado parasito (Aguirre & Tabor, 2008; Rhyan & Spraker, 2010; Slenning, 2010). Em áreas endêmicas, onde mais de uma espécie de *Leishmania* está presente, caracterizar o parasita é muito importante para a compreensão da história natural da doença (Quaresma et al., 2011).

Para detectar e identificar espécies de *Leishmania* em hospedeiros sinantrópicos e silvestres utilizamos diferentes técnicas e alvos moleculares para aumentar a chance de encontrar animais infectados. Utilizando a LnPCR não foi possível encontrar DNA de *Leishmania* spp. nos pequenos mamíferos amostrados. A PCR-RFLP do hsp70 foi responsável pela identificação de DNA de *Le. braziliensis* em uma amostra de fígado, pertencente a espécie *T. apereoides* da área de mata, e uma amostra de pele orelha, referente a *D. albiventris* capturado na área de transição. Nossos resultados mostram que a espécie *Le. braziliensis* está presente no distrito de Barra do Guaicui, onde nos últimos anos vêm sendo relatados casos humanos de leishmaniose tegumentar.

A espécie *T. apereoides* apresenta importância epidemiológica no Brasil sendo considerado um dos principais reservatórios de *Yersinia pestis* nos focos de peste bubônica no Nordeste do país (Brasil, 2008). Pela PCR-RFLP do hsp70 para detectar DNA de *Leishmania*, Quaresma et al. (2011) também

demonstraram a positividade deste roedor para *Le. braziliensis* em amostras de fígado, além de amostras de pele de cauda e pele de orelha. Neste mesmo estudo a detecção de DNA de *Le. chagasi* e *Le. guyanensis* foi observada em pele de orelha de *T. apereoides* proveniente de Terra Indígena Xakriabá localizada no norte do estado de Minas Gerais. Este roedor também já foi encontrado com DNA de *Le. infantum* e por parasitos do complexo *Le. mexicana* no sudeste do Brasil (Oliveira et al., 2005).

O gênero *Didelphis* é composto por espécies consideradas importantes reservatórios silvestres de agentes patogênicos. *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* foram encontrados naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* (Deane, 1961; Fernandes et al., 1989; Grisard et al., 2000; Xavier, 2007) enquanto no estado de São Paulo, *D. albiventris* foi encontrado com *Schistosoma mansoni* (Kawazoe, Dias & Piza, 1978). *D. albiventris* foi a segunda espécie mais coletada em nosso estudo. Em algumas regiões brasileiras estes marsupiais podem também ser apontados como possíveis reservatórios de *Leishmania*, assumindo um importante papel nos ciclos de transmissão dos agentes da LT no Brasil, por já ter sido encontrado infectado por *Le. braziliensis*, (Alexander et al., 1998; Brandão Filho et al., 2003; Schallig et al., 2007; Quaresma et al., 2011, Ferreira et al., 2015) e por *Le. guyanensis* (Arias et al., 1981).

Assim como o nosso encontro de DNA de *Le. braziliensis* em amostra de pele de orelha de *D. albiventris*, Ferreira et al (2015) relatam a infecção por esta mesma espécie de parasito em pele de orelha de animais provenientes de Belo Horizonte. Os autores demonstram uma maior taxa de infecção em pele

de cauda de *D. albiventris*, bem como a infecção mista por *Le. braziliensis* e *Le. infantum*.

O fato da espécie *D. albiventris* ter sido capturada no ambiente urbano, de transição e de mata, constatando seus hábitos sinantrópicos, associado ao achado de infecção natural, aventa para a possibilidade deste marsupial estar contribuindo para a ligação entre os ciclos de transmissão silvestre e urbano da *Le. braziliensis* no distrito de Barra do Guaicui.

É interessante salientar que apesar de não ter sido detectado o DNA de *Leishmania* nos exemplares da espécie *R. rattus* capturados em Barra do Guaicui, estes animais já foram encontrados infectados por diferentes espécies deste parasito em regiões do Brasil. Em Araçuaí, MG, Oliveira et al. (2005) detectaram neste roedor sinantrópico DNA pertencente aos subgêneros *Le. (Viannia)* e *Le. (Leishmania)*. Quaresma et al. (2011) verificaram a presença da infecção por *Le. infantum* em exemplares capturados no peridomício de residências na comunidade Xakriabá, norte de MG e Ferreira et al. (2015) observaram infecção por parasitos do complexo *Le. braziliensis* e infecção mista por parasitos dos complexos *Le. braziliensis* e *Le. donovani* em Belo Horizonte, Minas Gerais. No nordeste brasileiro Vasconcelos et al. (1994) e Brandão-Filho et al. (2003) em áreas endêmicas para LT encontraram animais desta espécie infectados por *Le. braziliensis*.

6.4 Abordagem epidemiológica das leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, com ênfase para o Distrito de Barra do Guaicui.

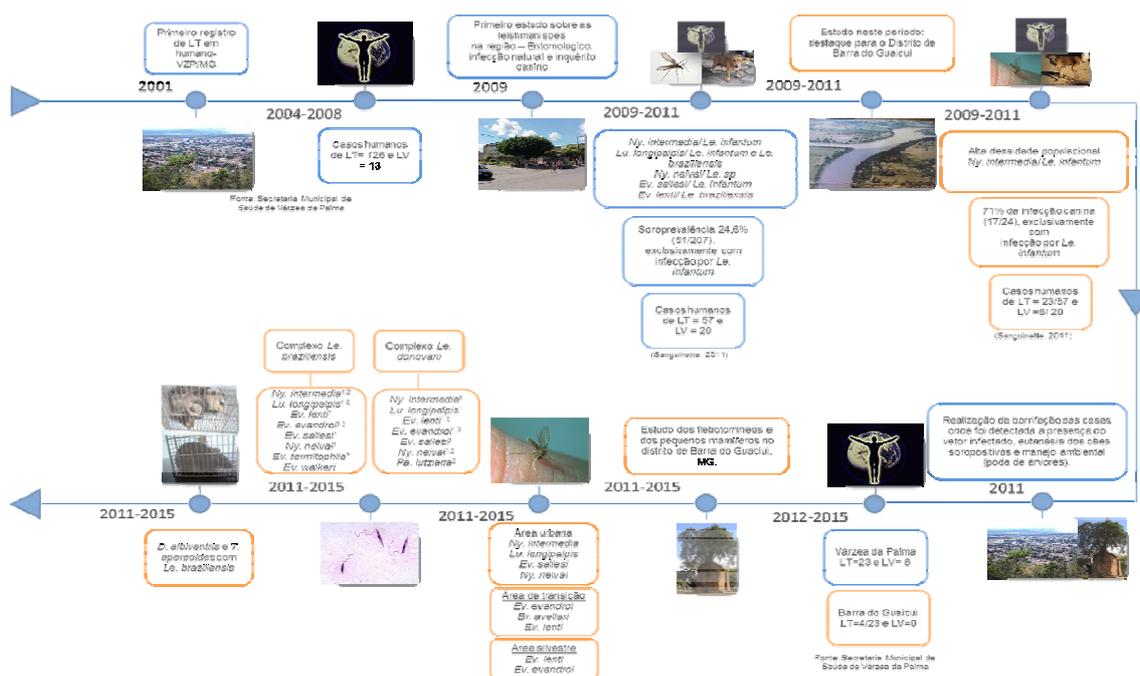


Figura 23: Linha do tempo sobre a epidemiologia das leishmanioses no município de Várzea da Palma, MG, com ênfase para o distrito de Barra do Guaicui (quadros na cor laranja), no período de 2001 a 2015. ¹ área urbana, ² área de transição e ³ área de mata.

Nosso estudo foi norteado por algumas questões surgidas após a realização do primeiro estudo na área urbana do município de Várzea da Palma, no período de 2009 a 2011 (Sanguinette, 2011) onde foi realizado o levantamento da fauna flebotômica, inquérito sorológico canino e investigação da presença de DNA de *Leishmania* nos flebotômicos e cães. Naquela época, a zona político-administrativa de número 5, representada pelo distrito de Barra do Guaicuí, foi responsável por 52,3% (23/44) dos casos humanos autóctones de LT e 66,7% (8/12) de LV registrados para o município de Várzea da Palma. Associado a esta informação, foi verificado uma alta densidade populacional da espécie *Ny. intermedia* (65%-8.608/13.147), seguida de *Lu. longipalpis* (27,9% - 2.558/9.182) e *Ny. neivai* (97,6% - 1.430/1.465), espécies vetoras de *Leishmania*. A presença de DNA de *Le. infantum* foi detectada apenas na espécie *Ny. intermedia* (54,2% - 13/24) e em um espécime de *Ev. sallesi* (5,5% - 1/18) . Por sua vez, dos 24 animais positivos para a presença de DNA de *Le. infantum*, o maior número de casos foi na Zona 5 (71% - 17/24). Estes achados indicaram que o distrito de Barra do Guaicui é um ambiente propício para a transmissão de *Le. infantum* para os cães o que conseqüentemente aumenta o risco de transmissão para o homem. Além disso, o bioma cerrado tem experimentado significativos impactos ambientais causados pelo desmatamento. Neste contexto, o estabelecimento de alta densidade demográfica, grupos de assentamentos rurais e áreas periurbanas sem infra-estrutura adequada geralmente resulta em contato próximo entre as pessoas e vetores de patógenos (Vilela et al., 2013). Todas estas características vêm sendo observadas para o município de Várzea da Palma.

Para uma melhor compreensão da epidemiologia da leishmaniose tegumentar e visceral no distrito de Barra do Guaicui este estudo buscou identificar os possíveis reservatórios silvestres e sinantrópicos envolvidos na transmissão da infecção nesta localidade. Este conhecimento associado ao estudo das espécies de possíveis vetores envolvidos na transmissão auxilia na compreensão e definição dos diferentes padrões epidemiológicos da doença no Brasil (Shaw, 2007).

A identificação dos parasitos presentes na infecção de pequenos mamíferos revelou a presença de espécies pertencentes ao complexo *Le. braziliensis*, que associada aos resultados de detecção de DNA de *Leishmania* dos flebotomíneos pelo mesmo parasito, confirmam a ocorrência de um ciclo de transmissão ativa destes protozoários na área de transição e silvestre do distrito de Barra do Guaicui. O fato de ter sido registrado casos de LT em humanos e não ter encontrado animais positivos na área urbana, pode estar relacionado ao baixo número de animais coletados, reduzindo a chance de detecção do DNA do parasito, ou mesmo a entrada dos seres humanos no ambiente de mata para busca de lenha e caça, visto que a LT é uma zoonose originalmente silvestre. Entretanto, o processo de expansão geográfica vem modificando a epidemiologia e os padrões de transmissão da LT, e atualmente sua ocorrência não mais se restringe a pessoas que entram em contato com matas e animais silvestres, ocorrendo também em áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas (Gomes, 1992; Kawa et al., 2010; Shimabukuro et al., 2010; Bacha et al., 2011).

A espécie *D. albiventris* foi coletada nos ambientes de mata, urbano e de transição, sendo encontrada positiva nesta última localidade. Sabendo que o deslocamento de uma espécie de um a outro estrato do ambiente implica na possibilidade de dispersão de seus parasitos, contribuindo para o estabelecimento de novos focos de transmissão (Jansen et al., 1999), este marsupial poderia estar servindo de elo na dispersão dos parasitos do complexo *Le. braziliensis* nesta localidade. Por ser considerado reservatório de *Le. infantum* (Sherlock, 1996; Brasil, 2006) e ter sido coletada a principal espécie vetora deste parasito, *Lu. longipalpis*, merece atenção o encontro deste marsupial na área de estudo.

Um fato interessante do nosso estudo é a predominância das espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* encontradas positivas apenas no ambiente peridomiciliar e na área de transição diferentemente do observado na área de mata onde estas espécies foram coletadas em pequeno número e não foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* sp.. Estas espécies estão envolvidas na veiculação dos agentes etiológicos da LV e LT respectivamente em várias áreas endêmicas do Brasil (Rangel & Lainson, 2003; Andrade-Filho et al. 2007). Vale ressaltar que apesar destas observações, mesmo em locais com baixa densidade populacional, o potencial da espécie como vetor do parasito garante a ocorrência de um ciclo de transmissão (Carvalho et al., 2010; Menezes et al., 2015).

Os nossos achados em flebotomíneos e pequenos mamíferos, juntamente com os resultados da presença de DNA de *Le. infantum* em cães e flebotomíneos demonstrados por Sanguinette (2011), e a ocorrência de casos

autóctones de LV e LT (Figura 20), nos leva a sugerir a participação do cão como hospedeiro da *Le. infantum* no ambiente urbano do distrito de Barra do Guaicui, tendo a espécie *Lu. longipalpis* como vetor primário e *Ny. intermedia* como vetor secundário. Possivelmente, a transmissão esteja ocorrendo no ambiente urbano, visto a alta soroprevalência canina, a alta abundância e positividade do vetor, constatada nestes seis anos de pesquisa no distrito de Barra do Guaicui.

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2006), na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção para os vetores e conseqüentemente um importante mantenedor do ciclo da *Le. infantum* neste ambiente. Em áreas endêmicas a presença de animais domésticos é comumente associada a fatores de risco de transmissão das leishmanioses (Reithinger & Daves, 1999; Sosa-Estani et al., 2001; Reithinger et al., 2003).

Também foi possível sugerir a participação do marsupial *D. albiventris* e do roedor *T. apereoides* como hospedeiros ou mantenedores da(s) espécie(s) de parasito(s) do complexo *Le. braziliensis*, no ambiente silvestre. Estes dados corroboram com outros estudos onde o relato de pequenos roedores e marsupiais infectados por *Le. braziliensis* e o encontro de DNA do parasito nos tecidos destes mamíferos sugere que eles possam estar envolvidos na manutenção desta espécie em ambientes naturais (Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

Considerando o alto índice de abundância (SISA) de *Ev. lenti* e *Ev. evandroi*, quando analisamos todos os ambientes amostrados, e o fato destas

espécies terem sido encontradas com DNA de parasitos do complexo *Le. braziliensis*, aventamos para a possibilidade das mesmas estarem participando do ciclo de transmissão deste parasito no distrito de Barra do Guaicui. Provavelmente, a transmissão para o homem ocorra no ambiente de mata considerando os hábitos de contato constante da população com esta área. Assim como neste estudo, foi observada uma maior abundância (SISA) da espécie *Ev. lenti* em investigação conduzida em Mato Grosso do Sul, estando este díptero presente em vários ambientes amostrados (Dorval et al., 2009). No estado de Goiás uma associação significativa desta espécie com casos de leishmaniose cutânea foi observada (Martins et al., 2002).

Nossas observações reforçam algumas das hipóteses levantadas por outros estudos, que também foram conduzidos na região norte do estado de Minas Gerais, por Quaresma et al (2011) e Rego (2013). Foi proposta pelos autores a participação da espécie *D. albiventris* e do cão doméstico como hospedeiro/reservatório do ciclo da *Le. braziliensis* no ambiente peridomiciliar e dos pequenos mamíferos *T. apereoides* e *Gracilinanus agilis* no ambiente silvestre. Por sua vez, o cão e o roedor *R. rattus* foram sugeridos como hospedeiro da *Le. infantum* no ambiente peridomiciliar e *Rhipidomys mastacalis* e *T. apereoides* no ambiente silvestre, tendo as espécies *Ny. intermedia* e *Ev. lenti* como vetores do ciclo de transmissão da *Le. infantum*. Diante destes dados, e dos relatos de outros autores citados nesta discussão, fica cada vez mais instigante e necessária a compreensão do papel de *Ny. intermedia* como vetor da *Le. infantum* no Brasil.

Dentre as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, a aplicação de inseticidas tem contribuído na redução da população de flebotomíneos e conseqüentemente da transmissão de *Le. infantum*, apesar de ser um método que muitas vezes é dificultado pela recusa da população e limitações na operacionalização (Souza et al., 2008; Barata et al., 2011; Santana-Filho et al., 2012). Foi possível verificar a ausência de registro de caso humano de LV, no distrito de Barra do Guaicui, deste o emprego das medidas de controle realizadas em julho de 2011, até os dias atuais. Costa et al. (2007) apontam um efeito protetor da eliminação de cães infectados adicionalmente ao efeito protetor da borrifação intradomiciliar na incidência da infecção por *Le. infantum*, mostrando que em comparação com os lotes que receberam apenas borrifação intradomiciliar, a eliminação dos cães soropositivos diminuiu em 80% a incidência da infecção. No município de Montes Claros, área endêmica de LV em Minas Gerais, foi demonstrada a redução do número de flebotomíneos capturados no intra e peridomicílio, com um efeito residual de quatro meses após o segundo ciclo de borrifação, sugerindo uma aplicação anual de três a quatro ciclos de borrifação para alcançar um controle mais efetivo (Barata et al. 2011)

Para finalizar, ressaltamos que apesar destes dados promissores, ainda continuam ocorrendo casos autóctones da doença na região e, após um ano, foi possível observar a presença de alta densidade da população de flebotomíneos com o mesmo número de espécies sendo coletado, e mais de 50% dos espécimes sendo representados por importantes espécies vetoras, *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis*. Isso demonstra a necessidade de avaliar o

impacto das medidas de controle aplicadas, pois se estas forem empregadas isoladamente sem uma análise, podem acabar não atingindo o efeito desejado (Camargo-Neves et al., 2001) e, reforça o quão amplo, dinâmico e desafiador é o estudo e o controle das leishmanioses e todos os elos que compõe sua cadeia de transmissão: vetores, parasitos, hospedeiros/reservatórios, área de abrangência/ocorrência e ecossistemas. Esperamos com estas informações continuar auxiliando o controle das leishmanioses no município de Várzea da Palma e contribuindo para uma melhor qualidade de vida desta população.

7 CONCLUSÕES

- 1- A fauna flebotomínica do distrito de Barra do Guaicui, MG, apresentou quinze espécies pertencentes a oito gêneros, dentre elas, importantes espécies vetoras dos agentes etiológicos da LT e LV, sendo *Ny. intermedia* a espécie com maior densidade populacional durante todo o período de estudo e também a mais abundante na área urbana (SISA=1).
- 2- As espécies coletadas mostraram-se bem distribuídas entre os ambientes destacando o potencial risco de transmissão de *Leishmania* no ambiente urbano onde foi observada a maior densidade populacional e abundância de importantes espécies vetoras.
- 3- A riqueza de espécies foi muito semelhante entre as áreas apesar das diferentes características ecológicas entre os ambientes. A maior diversidade (H) e valores de uniformidade (J) foram encontrados na área de transição.
- 4- As espécies *Ev. sallesi*, *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* mostraram estar adaptadas ao ambiente antrópico.
- 5- A técnica da Nested PCR (LnPCR), dirigida a uma região do gene SSUrRNA, revelou-se exequível e prática na detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos.
- 6- O grande número de exemplares de *Lu. longipalpis* coletados e o encontro de DNA de parasitos do complexo *Le. donovani* apontam esta espécie como vetor primário de *Leishmania infantum* na área estudada.
- 7- A detecção de DNA, de parasitos do complexo *Le. donovani* e do complexo *Le. braziliensis*, nas fêmeas da espécie *Ny. intermedia*

associado a alta densidade desta espécie no peridomicílio e a ocorrência de casos de humanos de LV e LT, sugerem sua participação como vetor primário da *Le. braziliensis* e secundário da *Le. infantum*.

- 8- Foram identificadas três espécies de pequenos mamíferos na região e a infecção por *Le. braziliensis* circulando entre os roedores (*Trichomys apereoides*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) no ambiente silvestre.
- 9- A alta densidade populacional das espécies *Ev. lenti* e *Ev. evandroi*, bem como a presença de DNA de parasitos dos complexos *Le. donovani* e *Le. braziliensis* no ambiente de mata indica a necessidade de estudos para elucidar o envolvimento destas espécies no ciclo de transmissão no distrito de Barra do Guaicui.
- 10- Nossos resultados ajudam a compreender o processo gradual de sinantropização das espécies de flebotomíneos encontradas no estado de Minas Gerais, demonstrando que o município de Várzea da Palma apresenta todas as características necessárias para a expansão das leishmanioses, visceral e tegumentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar CM, Rangel EF, Grimaldi Filho G, Momem H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987. 82(1): 143.

Aguirre AA, Tabor GM. Global factors driving emerging infections disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1.149: 1-3.

Alexander B, Lozano C, Barker DC, Mccann SHE, Adler GH. Detections of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop* 1998; 69: 41-50.

Alexander B & Usma MC. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Trop Med and Parasitology* 1994; 88: 543-549.

Alves WA. Leishmaniasis: current situation in Brazil. *Bol Epidemiol Paul* 2009; 6: 25–29.

Alves GB, Oshiro ET, Leite MC, Melão AV, Ribeiro LM, Mateus NLF, et al. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, state of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 437-443.

Andrade AJ, Gurgel-Gonçalves R. New record and update on the geographical distribution of *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America. *Check List* 2015; 11(2): 1566.

Andrade ARO, Dorval MEMC, Andrade SMO, Marques A, Júnior MSCL, Silva BAK, Andreotti R. First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania (Leishmania) chagasi* captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. *J Trop Disease* 2011; 1: 253–258.

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

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.

Araújo Filho NA. Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar na Ilha Grande [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1979.

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

Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981. 76: 279-286.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-1281.

Austad SN. The adaptable opossum. *Sci Am* 1988; 258: 54–59.

Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2011. 105(3):173-178.

Barata RA, Michalsky EM, Fujiwara RT, França-Silva JC, Rocha MF, Dias ES. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2011; 27(11):2117–23.

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

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Johnson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 536-546.

Bonvicino CR, Lindbergh SM, Maroja LS. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz J Biol* 2002; 62:765–74.

Borodin PM, Barreiros-Gomez SC, Zhelezova AI, Bonvicino CR, D'Andrea PS. Reproductive isolation due to genetic incompatibilities between *Thrichomys*

pachyurus and two subspecies of *Thrichomys apereoides*. *Genome* 2006; 49:159–167.

Braggio E, Bonvicino CR. Molecular divergence in the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *J Mammal* 2004; 85: 316–320.

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

Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito ME, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 488–494.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 291-296.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed. MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

ISBN 85-334-0742-4. Disponível em: < 105

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>.

Acesso em: 28 abril 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atualizada. Brasília: Ed.MS, 2007.180 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf >. Acesso em: 28 abril 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da peste. 1 ed. Brasília: Ed. MS, 2008. 92 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1493-8.

Brasil. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília- Ministério da Saúde. 2011. 78p.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em:<
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>.
Acesso em: 28 abril 2015.

Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves, JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). An Soc Entomol Brasil 1997; 26: 191-193.

Brazil RP, Passos WL, Fuzari AA, Falcão AL, Andrade Filho JD. The peridomestic sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in áreas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J Vector Ecol* 2006; 31: 418-420.

Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46(3): 263-264

Brazil RP, Rodrigues AF, Andrade Filho JD. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas-A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol* 2015; 4: 144. doi:10.4172/2161-0983.1000144

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

Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spinola, RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 1263-1267.

Carreira JC, da Silva AV, de Pita PD, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit Vectors* 2012; 5: 111.

Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, Santana ALF, Costa SM et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors* 2013; 6: 325.

Carvalho MR. Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco [Dissertação de mestrado]. Recife (PE). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ ; 2005.

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

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

Carvalho GML, Gontijo CMF, Falcão AL, Andrade Filho JD. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J Med Entomol* 2010; 47 (6): 972–976.

Carvalho, Gustavo Mayr de Lima. Flebotomíneos vetores e prevalência da Leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil. Belo Horizonte: [s.n.], 2006. 129 p. il. Orientação: Alda Lima Falcão; Co-orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_26.pdf. Acesso em: 19 maio 2013.

Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Bol Dir Malariol San Amb* 1995; 35: 77-84.

Cerboncini RAS, Passamani M, Braga TV. Área de vida de *Didelphis aurita* (Wied- Neuwied, 1826) pelos métodos de radiotelemetria e de carretéis de rastreamento. In: *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*; 2009. 13-17 set; São Lourenço: Minas Gerais; 2009. p. 1-3.

Chagas AW. Criação de flebótomos e transmissão experimental da leishmaniose visceral americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1940; 35: 327-333.

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

Coelho MV, Cunha AS, Falcão AR. Notas sobre um foco de calazar no sudoeste do estado de Goiás. *Rev Bras Malar Doen Trop* 1965; 17: 143-148.

Cordoba-Lanus E, De Grosso ML, Pinero JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98: 1-5.

Costa JM, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, et al. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. *Cad de Saúde Pública* 1995; 11: 321-324.

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 40(4):415–9.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A Nested polymerase chain reaction (LnPCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (1): 185-189.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2343-2347.

Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72: 132-141.

Cutolo AA, Teodoro AKM, Ovallos FG, Allegretti SM, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with opossum nests at urban sites in southeastern Brazil: a risk factor for urban and periurban zoonotic *Leishmania* transmission? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109: 391-393.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48: 151–156.

Daszak P et al. Collaborative research approaches to the role of wildlife in zoonotic disease emergence. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 315: 463-475.

De Freitas TP, D'Andrea PS, de Paula DA, Nakazato L, Dutra V, Bonvicino CR, et al. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 81–83.

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *Hospital* 1954; 45: 419-421.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela desinsetização domiciliária, em focos endêmicos de calazar no Ceará. *Rev Bras Malar Doen Trop* 1955; 7: 131-141.

Deane LM. Tripanossomatídeos de mamíferos da região amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1961; 3: 15-28.

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

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-243.

Dias ES, França-Silva JC, Da Silva JC, Monteiro ÉM, De Paula KM, Gonçalves CM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose

tegumentar no Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(1):49–52.

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

Eisenberg JF & Redford KH. Mammals of the Neotropics: the Central Neotropics. Chicago: University of Chicago Press; 1999.

Falqueto A. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo, [tese]. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84 pp.; 1995.

Fernandes AJ et al. Infecção natural das glândulas anais de gambá (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambu/Natural infection of opossum (*Didelphis albiventris*) anal glands by *Trypanosoma cruzi* at Bambuí-MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84:1 87-93.

Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, Valério SAN, Cunha HM, Paglia AP, Gontijo CMF. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. BMC Vet Research 2015; 11:71 DOI 10.1186/s12917-015-0392-y

Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitol 2007; 134(3): 369-77.

Fonseca GAB, Redford KH, Pereira LA. Notes on *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) of Central Brazil. *Ciênc. Cult.* 1982; 34(10):1359-1362.

Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occ Pap Conserv Biol* 1996; 4: 1-38.

Forattini OP. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera:Psychodidae). *Arch Hyg Saúde Publ* 1960; 25: 209-215.

Forattini OP & Santos MR. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em foco de leishmaniose tegumentar americana. *Arch Hyg Saúde Publ* 1952; 17: 171-174.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ* 1972; São Paulo 6: 431-433.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 1972; 6: 255-261.

Forattini OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ* 1976; São Paulo, 10: 31- 43.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariai Saneam Amb* 1995; 35: 133-142.

Galati EAB, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saú Públ* 1996; 30: 115-128.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 23-206.

Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC: Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop* 2003; 32: 235-261

Galati EAB, Marassá AM, Fonseca MB, Andrade RMG, Consales CA, Bueno EFM. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the speleological province of the Ribeira Valley: 3. Serra district – area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Entomol* 2010; 54(4): 665-676.

Gardner AL. Order Didelphimorphia. In: Wilson DE & Reeder DM, editors. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3 ed. Baltimore: John Hopkins University Press. 2005. P. 3-18.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2294 – 2297.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1- Estudo experimental da frequência de flebotomíneos em ecótopos artificiais com referência especial a *Ps. intermedius*. Rev Saúde Públ 1980; 14: 540-546.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB: Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. Rev Saude Publ 1983; 17: 23-30.

Gomes AC, Santos JLF, Galati EAB. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behaviour of the Sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. Rev Saúde Públ 1986; 20: 280-287.

Gomes AC, Galati EAB: Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7 – Capacidade vetorial flebotomínica em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publ 1989; 23: 136-142.

Gomes AC, Yoshimi IY, Capinzaiki AN, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana nº 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos Municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. Ver Inst de Medic Trop 1992; 34: 149-158.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (1): 71-80.

Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, Brasília 2004; 7: 338-349.

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

Grimaldi G, Jr Momen H, Naiff RD, Mahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 645-661.

Grimaldi-Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol* 1993; 6(3): 230-250.

Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, Toma HK, Campbell DA. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop* 2000; 74: 89-93

Grupo Cipa. Bermudes H, Dedet JP, Falcão AL, Feliciangeli D, Ferro C, Galati EAB, Gomes EL, Herrero MV, Hervas D, Lebbe J, Morales A, Oguzuku E,

Perez E, Rangel EF, Sherlock IA, Torres M, Vignes R, Wolff M. Proposition of a standart description for Phlebotomine sand flies. *Parasitol* 1991; 33: 127-135.

Guerra JAO, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa MG et al. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus, AM, Brasil. *Acta Amazon* 2007; 37: 133–138.

Hayek LAC, Buzas MA. *Surveing Natural Population*, Columbia University Press, New York 1997; 347-389.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 2011; 27(9) 403–409

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Minas Gerais - Belo Horizonte. Brasília: IBGE, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso: 17 jan. 2014.

Instituto Estadual de Florestas: Inventário Florestal de Minas Gerais. 2014. <http://geosisemanet.meioambiente.mg.gov.br/inventarioFlorestal>.

Jansen AM, Pinho APS, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (1): 203-204.

Jeronimo SMB, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 386-388.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P.

Global trend in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-993.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?

Trends Parasitol 2006; 22: 439-445.

Karagiannis-Voules DA, Scholte RGC, Guimarães LH, Utzinger J, Vounatsou P.

Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(5): e2213.

Kawa H, Sabroza PC, Oliveira, RM, Barcellos C. Production of transmission foci

for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil.

Cad Saúde Publica 2010; 26(8): 1495-1507.

Kawazoe U, Dias LCS, Piza JT. Infecção natural de pequenos mamíferos por

Schistosoma mansoni na represa de Americana (São Paulo, Brasil). *Rev Saúde*

Publ 1978; 12:200-208.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med Vet*

Entomol 1990; 4: 1-24.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special

references to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie*

Humaine et Comparée 1990; 65: 37-42.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin.*

Dermatol. 1999; 17: 279-289.

Kirwan GM, Barnett JM, Vasconcelos MF, Raposo MA, D'Angelo Neto S, Roesler I: Further comments on the avifauna of the middle São Francisco Valley, Minas Gerais, Brazil. *Bull Br Ornithol Club* 2004; 124: 207-220.

Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F: World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 2006; 15: 259-263.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1155.

Lacher TE, Alho CJR. Microhabitat use among small mammals in the Brazilian pantanal. *J Mammal* 1989; 70(2): 396-401.

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

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

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

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden, WHR, Evans DA. ed. - *Biology of the Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979, v. 2, P. 1-116.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RS, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 223-226.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Dwakelin. Topley & Wilson's, editores: *Microbiology and Microbial Infections* London: Academic Press; 1998. P. 241-266.

Lainson R, Shaw JJ. Chapter 17. New World leishmaniasis. In: Cox FEG, JP Kreier & D. Wakelin, ed. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, Sydney, Auckland, 2005, P. 313–349.

Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-827.

Lainson R. Especies neotropicales de *Leishmania*: una breve revisión histórica sobre su descubrimiento, ecología y taxonomía. *Revista Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2): 13-38.

Lara-Silva FO, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza Vde O, Pessanha JE, Regina-Silva S, Avelar DM, Silva MA, Lima AC, da Costa AJ, Machado-

Coelho GL, Dias ES. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* 2015; 148:128-36.

Lima BS, Dantas-Torres F, de Carvalho MR, Marinho-Junior JF, de Almeida EL, Brito ME, et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013; 107: 592–597.

Loiola CF, Silva DA, Galati EAB. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 581-585.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9375–80.

Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitol* 1994; 109: 135–138.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 2008; 24: 2941–2947.

Magill AJ. Leishmaniasis. In: Stickland, G.T. Hunter's Tropical Medicine and Emergins Infections Diseases 8 ed. 2000.

Marcelino AP, Ferreira EC, Avedanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 183: 54–8.

Marcondes CB, Falqueto A, Lozovei ALL. Influence of preparation methods on the dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 201-202.

Marcondes CB, Santos-Neto LG, Lozovei AL: Ecology of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Bra-zilian Atlantic Forest. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 255-260.

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News* 2007; 118: 351–356.

Margonari C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 2010; 47(6):1212-9.

Martins F, Silva IG, Bezerra WA, Maciel JM, Silva HHG, Lima CG, Cantuária PB, Ramos OS, Ribeiro JB, Santos AS. Diversidade e frequência da fauna

flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. *Rev Patol Trop* 2002; 31: 211-224.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publ* 1994; 10(2): 359-375.

Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA: Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 339-345.

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

Melo LA. "Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG." Dissertação apresentada ao Programade Pós-Graduação em Ciências da Saúde CPqRR/FIOCRUZ 2008; 105p.

Menezes JA, Ferreira EC, Andrade Filho JD et al. An Integrated Approach Using Spatial Analysis to Study the Risk Factors for Leishmaniasis in Area of Recent Transmission. *Bio Med Research International* 2015; ID 621854, doi:10.1155/2015/621854

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

Michalsky EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38 (2): 147-152.

Michalsky EM, Guedes KD, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(1): 58-62.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):185–8.

Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* (L.) *chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. *Cad Saude Publ* 2010; 26(12):2414-2419.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de

Jaciara, Estado de Mato, Grosso, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44: 76-78.

Monteiro EM, França Da Silva JC, Da Costa RT, Camargos Costa D, Andrade Barata R, De Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(2):147–52.

Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol 2003; 19 (7): 320-328.

Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. Biology of Disease Vectors. In: Marquardt WC, Black WC, Freier JE, Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG, editors: Elsevier San Diego; 2004. P. 141-151.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect 2007; 9:317–324.

Nascimento BWL, Saraiva L, Teixeira Neto RGA, Meira PCLS, Sanguinette CC, et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil. Acta Trop 2013; 125: 262– 268.

Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1968; 66 (2): 151-168.

Oliveira N, Gentile R, Fiszon JT. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. *Braz J Biol* 2005; 65: 495–501.

Oliveira AC, Batista SM, Falcão AL. Calazar em Minas Gerais. Revisão dos dados epidemiológicos obtidos até 1958. *Hospital* 1959; 56: 625-643.

Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saude Publica* 2003; 19: 933-944.

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

Oliveira EF, Silva EA, Casaril AE, Fernandes CES, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, Ribeiro AA, Brazil RP, Oliveira AG. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban área endemic for visceral leishmaniasis. *J Med Entomol* 2013; 50(2) 277-284.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 129: 219-227

Oliveira JA, Gonçalves PR, Bonvicino CR. Mamíferos da Caatinga. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC, editors. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife, Brazil: UFPE University Press; 2005. P. 375–84.

Paglia AP, Júnior PM, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. *Ver Bras Zool* 1995; 12(1): 67-79.

Paglia AP, Chiarello AG, Melo FR, Tavares V, Rodrigues F. Mamíferos. In: Drummond GM, Martins CS, Greco MB, Viera F, editors. *Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais - Subsídio ao Programa Biota Minas*. Belo Horizonte, Brazil: Fundação Biodiversitas Press; 2009. p. 298–314.

Pan American Health Organization (PAHO). Regional Office of the World Health Organization. Report Leishmaniasis. nº 1. 2013.

Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop*. 2006; 99: 252-259.

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafrente RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop* 2010; 115: 126-130.

Paraense WL & Chagas AW. Transmissão experimental da leishmaniose visceral americana pelo "*Phlebotomus intermedius*". Nota prévia. *Brasil-Médico* 1940; 54: 179-180.

Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, RebollarTéllez EA. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Med Vet Entomol* 2010; 24: 150-161.

Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1994; 88: 1614-1620.

Pessoa SB & Barreto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo 1948.

Peterson NE, Vexemat JA, Rosa ACOC, Lago PRL. Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 28.

Pimenta P, Turco S, Mcconville M, Lawyer P, Perkins P, Sacks D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 1992; 256:1812-1815.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil)

revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Acta Trop* 2005; 99: 905-913.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(1): 70-72.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105: 579-585.

Queiroz RG, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Pessoa FA, Sousa RN, David JR. Nucleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(6): 693-698

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol* 2009; 136 (14): 1915–34.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, AF Barbosa, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, Foco de leishmaniose tegumentar não Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 347-349.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Estudos Wermelinger e D. sobre a fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de Leishmaniose cutânea em Mesquita, Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 39-45.

Rangel EF, Meneses CRV, Cupolillo E, Azevedo ACR, Costa WA, Costa SM. Aspectos da ecologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e a fauna

flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão da *Leishmania (V) braziliensis* no Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 115.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das leishmanioses, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), *Flebotomíneos do Brasil* 2003; Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368pp.

Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24(12):2948–52.

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

Ready P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology* 2013; 58: 227-250.

Rêgo FD. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil. Belo Horizonte; 2012. Mestrado [Dissertação em Doenças Infecciosas e Parasitárias] – Centro de Pesquisas René Rachou.

Rêgo FD, Shimabukuro PHF, Quaresma PF, Coelho IR, Tonelli GB, Silva KMS, Barata RA, Dias ES, Gontijo CMF: Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xacriabá Indigenous Reserve, Brazil. *Parasit Vectors* 2014; 7: 220.

Rêgo FD, Rugani JMN, Shimabukuro PHF, Tonelli GB, Quaresma PF, Gontijo CMF: Molecular Detection of Leishmania in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. PLoS Biol 2015, 10: e0122038.

Reithinger R & Davies CR Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg 1999; 61 (4): 530–541.

Reithinger R, Espinoza JC, Davies CR. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huanuco, Peru. Am J Trop Med Hyg 2003; 69: 473–480

Rhyan JC; Spraker TR. Emergence of diseases from wildlife reservoirs. Vet Pathol 2010; 47 (1): 34-39.

Roberts DR, Hsi BP. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. Environ Entomol 1979; 8: 1007-1013.

Rocha JJ. Geografia histórica da Capitania de Minas Gerais. Descrição geográfica, topográfica, histórica e política da Capitania de Minas Gerais. Memória Histórica da Capitania de Minas Gerais / estudo crítico. Maria Efigênia Lage de Resende; transcrição e colação de textos Maria Efigênia e Rita de Cássia Marques. Belo Horizonte: Fundação João Pinheiro, Centro de Estudos Históricos e Culturais 1988.

Rodriguez N, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 9: 2.246-2.252.

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

Rogers M, Nikolaev A, Ferguson M, Bates P. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430:463-467.

Roque AL, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4: e589.

Roque ALR, Jansen A. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wild* 2014, 3(3): 251-262

Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 2001; 3: 189-196.

Sanguinette, Cristiani de Castilho. Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: Estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina. Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo e Jose Dilermando Andrade Filho. Belo Horizonte: [s.n.], 2011. 160 p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.

Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Santana-Filho FC, Silva J a., Magalhães DF, Meneses JNC, Haddad JP a, Morais MHF, et al. Recusas de borrição de imóveis e ocorrência de casos de leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2012; 64(4):899–908.

Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban áreas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasit* 2007; 150: 283-290.

Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12(3): 315-317.

Saraiva L, Carvalho GML, Sanguinette CC, Carvalho DAA, Falcão AL, Andrade-Filho JD. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 843–846.

Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46: 1159-1163.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, Lopes CRG, Moreno EC, Melo MN. Phlebotominae fauna (Diptera:

Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Tropica* 2011; 117: 137–145.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105 (8): 1033–1039.

Saraiva NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new World leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989; 159: 725-735.

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

Schallig HDFH, Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387-393.

Shaw J. New world leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In Farrel J, editors. *World*

Class Parasites: Leishmania. Vol 4. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2003. P. 11-31.

Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (5): 541-547.

Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia III – Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Rev Bras Malariol Doen Trop 1969; 21: 541-548.

Sherlock IA. Sobre o "*Phlebotomus lenti*" Mangabeira, 1936 (Diptera: Psychodidae). Rev Bras Biol 1957; 17: 77-88.

Sherlock IA, Sherlock VA. Sobre a infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. Revista Brasileira de Biologia. 1961; 21: 409-418.

Sherlock IA, Sherlock VA. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. Rev. Bras. Biol. 1972; 32: 209–217.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 515.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 671-683.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz 2003; 15-21.

Shimabukuro PHF, Silva TRR, Ribeiro FOF, Baton LA, Galati EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 2010; 3:121.

Silva AVM, de Souza Candido CD, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 2008;105(1):92-94.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(3):285–91.

Silva ES, Gontijo CM F, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12), 550-552.

Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 2006; 30: 637-643.

Silva JGDE, Werneck GL, Cruz MDSPE, Costa CHN, Mendonça IL. De. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cad Saude Publica* 2007; 23(7):1715–20.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE, Souza AA. Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania* (*Viannia*)

lainsoni from the rodent Agouti paca (Rodentia: dasyproctidae), in the state of Para, Brazil. Rev Inst Med Trop 1991; 33: 18-22.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília: Ministério da Saúde. 2008. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>.

Slennig BD. Global climate change and implications for disease emergence. Vet Pathol 2010; 47 (1): 28-33.

Smith ROA, Halder KC & Ahmed I. Further investigations on the transmission of kalaazar. Part HI: The transmission of kala-azar by the bite of the sandfly P. argentipes. Indian Journal of Medical Research 1940; 28: 585-591.

Smith ROA, Halder KC & Ahmed I. Further investigations on the transmission of kalaazar. Part VI: A second series of transmissions of L. donovani by P. argentipes. Indian Journal of Medical Research 1941; 29: 799-802.

Sosa-Estani S, Segura EL, Gomez A, Salomón OD, Peralta M, Couta V et al. Leishmaniose cutânea no norte da Argentina: fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34 (6): 511-7.

Sousa RG, Santos JF, Rodrigues HG, Tales Alexandre Aversi-Ferreira. Casos de leishmaniose visceral registrados no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. Acta Sci Health Sci 2008; 30 (2) 155-159.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Rangel EF: The Phlebotominae sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of two atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 319-324.

Souza VMM, Julião FDS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV, Lima ADS, et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2008; 17(2):97-106.

Swan GE, Coetzer JA, Terblanche HM. Integrating global animal health, public health and tropical animal health issues into the veterinary curriculum: a South African/African perspective. *Rev Sci Tech* 2009; 28: 727-738.

Teles CBG, Basano AS, Zagonel-Oliveira M, Campos JJ, Oliveira AFJ, et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46(1):60-66.

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

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

Travi BL, Osorio Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Exp parasitol* 1998; 88: 73-75.

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

Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 275-278.

Van der Auwera G, Dujardin J-C. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28 (2): 265-293.

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 133-142.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe-Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, et al. The identify of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. *Am Jour Trop Med Hyg* 1994; 50: 158-164.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna Flebotomínica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81(3): 293-301.

Vilela ML, Pita-Pereira D, Azevedo CG, Godoy RE, Britto C, Rangel EF. The phlebot- omine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with

an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108(5): 578-585.

Volf P, Myskova J. Sand flies and Leishmania: specific versus permissive vectors. Trend Parasitol 2007; 23 (3): 91-92.

Weigle KA, Labrada LA, Losano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia). J Clin Microbiol 2002; 40(2): 601-606

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2937-40.

World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis>>. Acesso em: 09 dezembro 2013.

World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis>>. Acesso em: 09 junho 2015.

Xavier DCA. Estudos entomológicos do Parque do Gafanhoto, visando a vigilância epidemiológica das Leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. [Monografia]. Divinópolis (MG): Fundação Educacional de Divinópolis, Universidade do Estado de Minas Gerais. 2007.

Ximenes MFFM, Castellón EG, Souza MF, Freitas RA, Pearson RD, Wilson ME, Jerônimo SMB. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. J Med Ent 2000; 37: 162-169.

ANEXOS

Anexo I - Licença para coleta de pequenos mamíferos não voadores (IBAMA)



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: 38834-1	Data da Emissão: 03/05/2013 16:00	Data para Revalidação: 02/06/2014
* 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: Epidemiologia das leishmanioses em Barra do Guacuí, Minas Gerais		
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

Anexo II – Licença para coleta e eutanásia de pequenos mamíferos (CEUA)

**LICENÇA****LW-7/14**

Certificamos que o protocolo (P-32/13-1), intitulado "Epidemiologia das leishmanioses em Barra do Guicuí, Minas Gerais", sob a responsabilidade de JOSE DILERMANDO ANDRADE FILHO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/12/2015 e inclui o uso total de:

Mesocricetus auratus

- 71 Fêmeas de Golden, Peso: 0,0100 Gramas).

Didelphimorphia

- 15 Machos,
- 10 Fêmeas.

Rodentia

- 30 Machos,
- 30 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE: 04628550

Anexo III – Artigo publicado: Sanguinette CC, Silva DF, Stumpp RGAV, Rego FD, Tonelli GB, Tanure A, Gontijo CMF, Andrade Filho JD. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. *Parasit vectors* 2015; 8:428. DOI 10.1186/s13071-015-1003-2

RESEARCH

Open Access



Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil

Cristiani de Castilho Sanguinetti¹, Danyele Franca da Silva¹, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp², Felipe Dutra Rego¹, Gabriel Barbosa Tonelli¹, Aline Tanure¹, Célia Maria Ferreira Gontijo¹ and José Dilemardo Andrade Filho^{1*}

Abstract

Background: Phlebotomines are directly related to the study of leishmaniasis, and so the study of their distribution plays an important role in the epidemiology of these diseases. Collections of phlebotomines were made with the intent of comparing the distribution, richness, diversity, and abundance of species in three distinct environments in an area endemic for tegumentary and visceral leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.

Methods: Phlebotomines were collected with automatic light traps in urban, transitional, and wild areas from March 2013 to February 2014 in the district of Barras do Guaiçuí, municipality of Várzea da Palma, Minas Gerais. The distribution patterns of these species of insects, as well as species richness, evenness, and abundance among the different areas, were analyzed.

Results: A total of 3,365 phlebotomines belonging to 15 species were collected. The urban area had the greatest abundance whereas the transitional area had the greatest diversity and evenness of species. *Nyssomyia intermedia* was the most abundant species in the urban area, whereas *Eviandromyia evandrii* was the most abundant in the transitional area and *Ex. lent* in the wild area.

Conclusion: The analysis of our results showed that the distribution of the collected species had distinct profiles between the environments studied. Furthermore, our study indicates the potential risk of transmission of leishmaniasis in the urban environment where it was observed had the highest population density and abundance of important vector species of *Leishmania*.

Keywords: Phlebotominae, Fauna, Vector ecology, Leishmaniasis

Background

Environmental changes derived from human actions, such as the rapid process of urbanization observed in emerging countries like Brazil, have changed the ecology of some species of phlebotomines and, consequently, the eco-epidemiology of the leishmaniasis. In respect of visceral leishmaniasis these changes lead to a

significant impact on the distribution and mortality rates of the disease since the 1980s [1, 2]. Thus, four new patterns have emerged: the transmission of visceral leishmaniasis (VL) in fully urbanized areas; the rapid spread in cities of the Northeast and in various cities in the North, Central-West, and Southeast; an increase in the number of cases in urban areas compared to rural areas; and the emergence of large-scale urban epidemics with cycles of ten years [3].

The increase in the number of cases of tegumentary leishmaniasis (TL) and VL in Minas Gerais in recent years is documented by the System of Information of

* Correspondence: psj@pau.fiocruz.br

¹Leishmaniasis Research Group, Phlebotominae Collection, National and International Reference Centre for Phlebotomines, René Barbosa Institute, Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Castilho Sanguinetti et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Disease Notification from 2000 to 2009, who reports that in Minas Gerais there is an average of 390 cases of VL annually [4, 5]. Currently, in Minas Gerais, the cities of Belo Horizonte, Montes Claros, Ribeirão da Neves, Januária, Santa Luzia and Paracatu correspond to 56 % of the VL cases reported in the state [6].

The first case of TL in the municipality of Várzea da Palma was reported in 2001 in the district of Barra do Guaiçuí. Since then, from 2004 to 2013, 202 human cases of autochthonous TL and 37 cases of VL have been reported (Source: Municipal Secretary of Health of Várzea da Palma, MG).

One of the challenges related to the control of leishmaniasis is the lack of knowledge about epidemiological conditions, especially regarding the distribution of phlebotomine populations, the behavior and the identification of these species. Thus, this study aims to present the distribution, richness, diversity, and abundance of species of phlebotomines related to urban, transitional, and wild environments in the district of Barra do Guaiçuí, an endemic area for TL and VL in Minas Gerais state. Not only can this information provide a more accurate description of the current situation of the sand fly fauna, but it can also be predictive, and thus allowing the establishment of more effective control methods and epidemiological surveillance in the region.

Methods

Study area

The study area, Barra do Guaiçuí (17°12'S and 44°48'W), is a district located in the municipality of Várzea da Palma in the northern region of Minas Gerais, Brazil (Fig. 1). According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics the municipality is represented by an area of 2,220,279 km² and a population, estimated in 2014, of 38,213 inhabitants [7].

The municipality varies in elevation between 480 and 800 m, with a mountain range that connects with the Serra do Cabral [8]. According to Köppen *et al.*, the climate is classified as tropical savanna with a dry season in the winter [9]. Várzea da Palma is situated in the savannah (cerrado biome) although some open areas east of Várzea da Palma show a caatinga biome influence. Small fragments of forest in various states of succession are also present forming a mosaic of vegetation that varies in complexity from shrubs to very dense forest [10]. The prevalent phytophysiognomies are open fields, cerrado *sensu stricto* and seasonal deciduous montane forest, with the best preserved areas of vegetation being found at higher elevations [8].

Collection of phlebotomine sand flies

The urban area (A) is located in the center of the district of Barra do Guaiçuí and has a population of 3,000

inhabitants, many brickwork buildings and some unoccupied areas that have become overgrown. The native vegetation, cerrado *sensu stricto*, is practically nonexistent and is replaced by other types of plants, principally mangos. The cerrado *sensu stricto* is characterized by the presence of low, twisted trees with irregular branches. The bushes and subshrubs are spread, with some species with perennial underground organs which allow regrowth after cutting or burning. The trunks of woody plants in general have shells with thick cork and rigid leathery leaves. These characters suggest adaptation to drought conditions. The organic matter content varies from medium to low [11].

The traps were exposed in the peridomiciliary areas and, when present, in chicken house, pig pen or kennel. These areas experience flooding during the rainy season due to the close proximity of the Velhas River.

The transitional area (T1), or semi-synanthropic area, is located in a remote village with a few nearby buildings. The sampled houses were at a distance of 10 meters from the forest and with the presence of animals such as horse, goat, chicken and dog, being created free. The native vegetation, seasonal deciduous montane forest, is present despite being widely used by residents as a source of firewood. Some nearby areas are used as pasture.

The wild area was sampled at three points (T2, T3 and T4) that were away from human habitations and feature native vegetation of seasonal deciduous preserved montane forest. This kind of forest has as a main feature two well-marked seasons, one rainy and the other a long drought in which more than half of the vegetation loses its leaves, allowing the presence of organic matter in the soil.

Phlebotomines were collected from March 2013 to February 2014 using HP-model automatic light traps [12]. A total of ten light traps were installed monthly: two in the transitional area (forest edge at a distance of 100 meters from the house); six in the wild area with two at each of the three sample points; and two in the peridomicile area of houses in the urban area (Fig. 2). The traps were set during three consecutive nights from 18:00 to 6:00 hours, totaling 36 hours of sampling effort per night for each trap. In all study sites traps were installed about 1 meter from the ground.

The traps were removed after each night so that sorting and sexing of phlebotomines could be performed. All specimens were prepared, mounted, and identified according to the routine procedures adopted by the National and International Reference Center for Phlebotomines (CRNIP) of the René Rachou/FIOCRUZ Research Center [13].

The collected phlebotomines were identified to species level using light microscopy. The classification followed the proposal of Galati [14]. The abbreviation of the

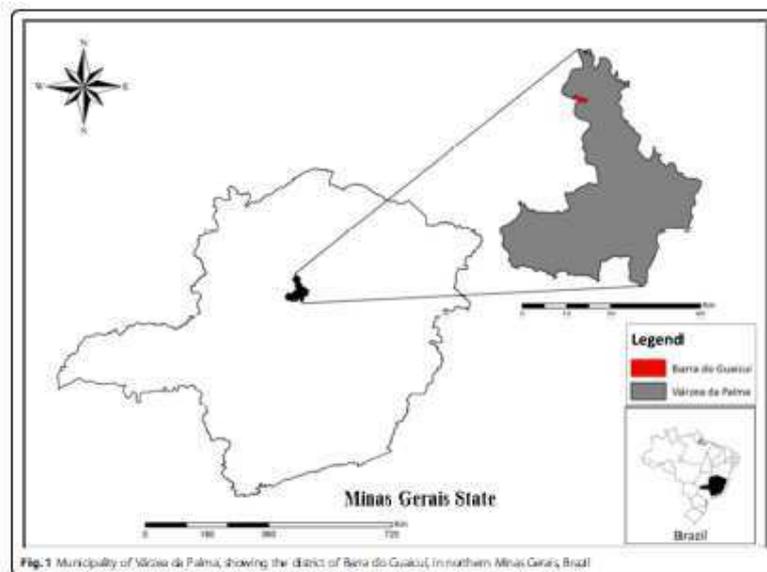


Fig. 1 Municipality of Várzea da Palma, showing the district of Barra do Guacuí, in northern Minas Gerais, Brazil

generic names in this study follows the proposal of Marcondes [15].

The different number of traps in each area resulted in different sampling efforts. These differences were mitigated by multiplying the total number of traps in an area by the number of days the traps were working. The sampling effort was used to calculate capture success, which indicates the actual efficiency of a type of trap in an area. Capture success was calculated using the total number of individuals divided by the sampling effort.

For the evaluation of the most abundant species in each area, the Index of Species Abundance (ISA) was converted into a scale of zero to one by the Standardized Index of Species Abundance (SISA). In this index, value one corresponds to the most abundant species [16]. Richness is considered as the total number of species, and abundance is considered the total number of individuals collected. The diversity and evenness of species of phlebotomines from the different areas were estimated by using the diversity index of Shannon-Wiener (H') and Pielou (J), respectively [17]. For the species most prevalent in the study, abundances were compared for each species between areas using Analysis of Variance (ANOVA).

Ethical approval

Collection procedures were approved by the "Ministério do Meio Ambiente do Brasil" - (SISBIO) license number 15,237.

Results

The phlebotomine fauna was represented by 15 species. Table 1 shows the total number of phlebotomines collected by study area, and also the Shannon diversity index (H') and the evenness of Pielou (J). The monthly samples yielded 3,865 specimens of phlebotomines, of which 1,900 were males (56.46 %) and 1,465 were females (43.54 %).

The urban area had the greatest number of phlebotomines collected with 2,012 individuals, followed by the forest area with 1,127, and the transitional area with 226. By standardizing the number of phlebotomines collected in the different areas, due to differences in sampling effort, the capture success was also highest in the urban area (27.94 phlebotomine/trap), followed by the forest area (5.22), and lastly the transitional area (3.14).

Considering all of the sampled areas, the species most frequently trapped was *Ny. intermedia* with 34.92 % of

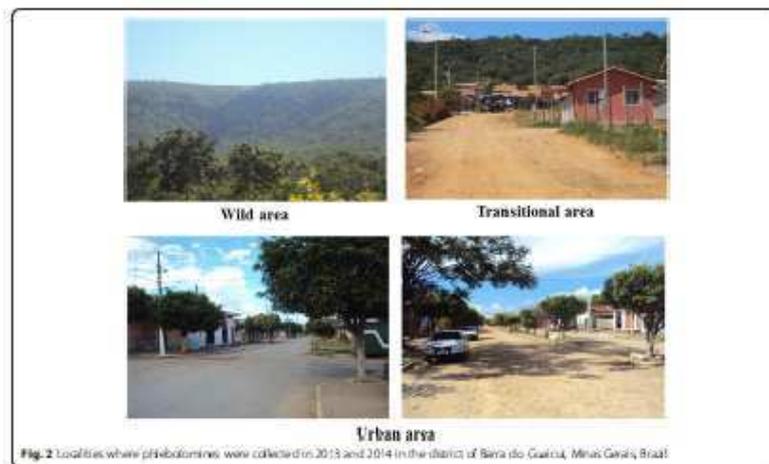


Fig. 2 Localities where phlebotomines were collected in 2013 and 2014 in the district of Serra do Galvão, Minas Gerais, Brazil

Table 1 Species of phlebotomines collected during March 2013 to February 2014 in the municipality of Várzea da Palma, Minas Gerais, Brazil, by study area and sex and with their respective diversity (H') and evenness (J') indices

Taxonomic category	Urban area		Transitional area		Wild area				Total (%)		
	A		T1		T2		T3			T4	
	F	M	F	M	F	M	F	M		F	M
<i>Burtonomyia ovalis</i>	13	15	33	25	48	102	9	10	22	40	317 (3.42)
<i>Erandomyia maculosa</i>	6	8	49	9	141	19	29	4	97	16	378 (11.23)
<i>Erandomyia kneri</i>	16	35	6	36	27	195	9	35	28	140	527 (15.66)
<i>Erandomyia azela</i>	52	27	5	0	15	1	12	12	14	5	148 (4.25)
<i>Erandomyia tentaculata</i>	1	3	2	0	12	3	4	0	14	1	40 (1.18)
<i>Erandomyia walkeri</i>	2	8	0	2	2	2	1	0	1	1	19 (0.56)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	101	425	2	19	1	12	0	4	2	5	581 (17.27)
<i>Misopogonmyia quinquefasciata</i>	14	16	0	0	0	0	0	0	0	1	31 (0.92)
<i>Nyssomyia swinmedia</i>	589	539	10	17	1	4	4	2	9	0	1,175 (34.02)
<i>Nyssomyia neivai</i>	52	26	2	3	0	2	0	1	0	1	137 (4.07)
<i>Nyssomyia whitnawi</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.03)
<i>Psittomyia psittaci</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2 (0.06)
<i>Psittomyia lucasae</i>	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	4 (0.12)
<i>Psittomyia ligata</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	4 (0.12)
<i>Scopomyia axillaris</i>	1	0	0	2	0	2	0	1	0	0	6 (0.18)
Total (%)	2,012 (59.78)		226 (6.72)		1,127 (33.48)						3,365 (100)
Diversity index (H')	1.2823		1.8694		1.5572						1.8529
Evenness index (J')	0.4990		0.7288		0.5901						0.6842

A = urban area; T1 = transitional area; T2-T4 = wild area

the total number of phlebotomines collected, followed by *Lu. longipalpis* 17.27 %, *Ev. leutz* 15.66 %, *Ev. evandroi* 11.23 %, *Br. avellari* 9.42 % and *Ny. neivai* and *Ev. sallesi*, both with 4.07 %.

When testing these seven most prevalent species using ANOVA, four (*Ev. sallesi*, *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* and *Ny. neivai*) showed significant differences in abundance among study sites ($p < 0.05$), with greater abundance in the urban area (Table 2).

Species richness of phlebotomines was approximately equal in all of the areas, with 14 species being collected in the wild area and 13 in both the urban and transitional areas. The transitional area had the highest diversity and evenness values, 1.869 and 0.728, respectively, whereas the urban area had the lowest, 1.282 and 0.499, respectively (Table 1).

The species *Ny. whitmani* was encountered exclusively in the transitional area whereas *Mi. quinquefor* and *Pa. bigeniculata* were not collected in this area. *Antomyia pessoai* was collected only in the transitional and wild areas.

In the urban area, *Ny. intermedia* was the most abundant species with SISA = 1, followed by *Lu. longipalpis* (SISA = 0.50), *Ny. neivai* (0.40) and *Ev. sallesi* (0.38). In the transitional area, *Ev. evandroi* was the most abundant (0.75) followed by *Br. avellari* (0.67) and *Ev. leutz* (0.50). This latter species was the most abundant species in the wild area with SISA = 0.92, followed by *Ev. evandroi* (SISA = 0.61). *Nyssomyia intermedia*, *Lu. longipalpis* and *Ev. sallesi* were well distributed in the transitional and wild areas with very close SISA values (Fig 3).

Discussion

The presence of 15 species of phlebotomines in the collections made in the district of Barra do Guacuí

matches previous findings for the northern region of the state of Minas Gerais [18, 19].

The phlebotomine fauna found in the district of Barra do Guacuí showed to be diverse and predominantly comprised of important vector species, such as *Lu. longipalpis* and *Ny. intermedia* that are involved in disseminating the etiologic agents of VL and TL, respectively [20, 21]. In addition to these species, *Ev. leutz*, *Br. sallesi*, *Ny. neivai* and *Ny. whitmani* deserve attention because they have been found naturally infected and some may be involved in the wild and/or urban cycle of leishmaniasis [21–24]. This faunistic composition is typical of modified environments near secondary forests, as seen in other areas of southeastern Brazil [25].

The species with the highest density was *Ny. intermedia*, followed by *Lu. longipalpis*. These results are different from those observed in other studies conducted in northern Minas Gerais, where *Lu. longipalpis* was identified as the predominant species [19, 26, 27].

It is understood that there is a correlation between the density of *Lu. longipalpis* and peridomicile conditions and this species is frequently associated with the presence of domestic animals [28, 29]. This behavioral characteristic was evident in the present study, since there were a greater number of individuals of this species in samples from peridomicile locations in urban area, with the presence of breeding animals.

The species *Ny. intermedia* was predominant in the urban area. This species is considered of great importance in the transmission of *Leishmania braziliensis* in southeastern Brazil [21, 30]. In Minas Gerais, *Ny. intermedia* is present or quite abundant in endemic areas of TL. Gonijo et al., in a study conducted in a TL outbreak in Vale do Iquitinhonha, Minas Gerais, Brazil described the prevalence of *Ny. intermedia* in the region and its preference for environments with a great degree of anthropic modification [31]. According to the high population density encountered in the district of Barra do Guacuí, *Ny. intermedia* may be participating in the transmission cycle of *Leishmania* species along with *Lu. longipalpis*.

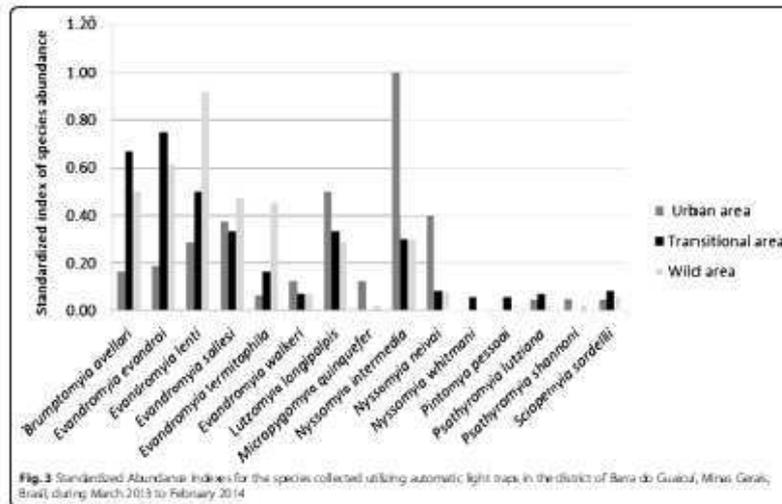
When comparing the number of specimens in each studied environment greater capture success is evident in the urban environment. This capture success can be explained by the presence of domestic animals near the places where the traps were exposed. However, with regard to diversity, the opposite was observed, with the transitional area showing the greatest diversity, followed by the wild environment and lastly the urban area. The same trend was observed for the evenness index, which remained high in places with the greatest diversity of species, but low in the urban area, where *Ny. intermedia* showed absolute dominance.

The fact that the urban area possesses some rural characteristics, such as livestock and subsistence crops,

Table 2 Main species of phlebotomines collected in urban, transition, and wild areas of the district of Barra do Guacuí, Minas Gerais, Brazil, during March 2013 to February 2014

Species	Study area						Total
	Urban		Transitional		Wild		
	N	%	N	%	N	%	
<i>Antomyia avellari</i>	28	0.86	58	1.78	231	7.09	317
<i>Evandromyia evandroi</i>	14	0.43	58	1.78	306	9.39	378
<i>Evandromyia leutz</i>	51	1.57	42	1.29	434	13.32	527
<i>Evandromyia sallesi</i>	20	2.42 ^a	5	0.15 ^b	59	1.81 ^b	143
<i>Leishomyia longipalpis</i>	536	16.45 ^a	21	0.64 ^b	24	0.74 ^b	581
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1128	34.62 ^a	27	0.83 ^b	20	0.61 ^b	1175
<i>Nyssomyia neivai</i>	128	3.92 ^a	5	0.15 ^b	4	0.12 ^b	137

^a Different letters indicate significant differences between the columns $p < 0.05$.



probably led to it having the largest number of insects collected. Some authors emphasize the importance of pigsties or chicken coops as risk factors because they serve as locations for the creation and maintenance of a high density of phlebotomines [32–35]. The greatest diversity (H) in the transitional area can also be explained by the fact, that it is located between the forest and the urban environment.

The analysis of species abundance among the three areas showed different results in each of them, with absolute predominance of *Ny. intermedia* in the urban area, *Ev. evandroi* in the transition area and *Ev. lenti* in the wild area. Galati *et al.*, also reported *Ny. intermedia* to have the highest SISA ranking in the Provincia Espeleológica do Vale do Ribeira, state of São Paulo, Brazil [36]. The populations of the species collected in the transitional and wild areas seem better adapted to forest environments, a fact also reported by other authors [37–39], unlike those species that predominate in urban areas that are better adapted to anthropic environments or forest edge [40–42]. Beyond these above mentioned species, it is important to highlight the presence of *Lu. longipalpis* in urban areas, *Br. ovalleri* and *Ev. lenti* in the transition area and *Ev. evandroi* and *Br. ovalleri* in the wild area, all of these species with SISA above 0.50.

Thus, whereas both areas have similar phlebotomine faunas, differing only in a few species, the situations with regard to the abundance of vectors of *Leishmania* spp. (*Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ev. sallesi* and *Lu. longipalpis*) are completely different. It was possible to confirm the pattern of adaptation of these species to peridomestic areas and the modified environment of the municipality of Várzea da Palma. The predominance of some species in urban environments is a relevant factor for the transmission of *Leishmania* species and has been mentioned in other faunal studies of phlebotomines [37, 43–45].

Although *Ny. whitmani* is represented by only one specimen in the district of Barra do Guaiçú, this finding requires special attention because of its implication as a potential vector of *L. braziliensis* in the northeast region of Brazil [20, 45].

Interesting to highlight the greater abundance of *Ny. intermedia* compared to *Lu. longipalpis* in the urban area of Guaiçú bar district. This finding is different from that reported in studies in urban areas of Minas Gerais, where the predominance of *Lu. longipalpis* is always registered [46–48]. *Nyssomyia intermedia* was found naturally infected by *Leishmania infantum* in Minas Gerais State and other regions of Brazil [22, 49, 50] and the highest population density in the urban area, which

can be an indication that in this area this species may be playing a role in the transmission cycle of the *L. infantum*.

Conclusion

In a year of sand flies collection it was possible to demonstrate the distribution, richness and abundance of species in three different ecotypes. The distribution of the collected species showed distinct profiles between the environments, highlighting the potential risk of transmission of leishmaniasis in the urban environment where it was observed the highest population density and abundance of important vector species of *Leishmania*. Despite the different ecological characteristics between environments the richness of species was very similar between the areas. The results of this study contribute to understanding the gradual urbanization of the species of sand flies found in the state of Minas Gerais. Furthermore it demonstrates that the municipality of Várzea da Palma has several important characteristics for the expansion of visceral and cutaneous leishmaniasis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CCS, DFS, RGAVS, FDN, GBT, AV and EDW participated in the collection of phlebotomines. CCS, DFS and EDW were responsible for the identification of specimens and CCS, CMFG and EDW participated in economic discussions. CCS, CMFG, RGAVS, and EDW drafted the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank the inhabitants of the municipality of Várzea da Palma for granting them access to their communities. We also wish to thank the Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma for their valuable assistance. JD Andrade Filho and CMF Gonçalo are research fellows of CNPq.

Author details

¹Leishmaniasis Research Group (Phlebotomine Collection), National and International Reference Center for Phlebotomines, Biotec-Bachion Institute, Frontuz Av, Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Received: 27 May 2015 Accepted: 11 July 2015

Published online: 19 August 2015

References

- Wernick GL. Insect geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2003;19:297-40.
- Oliveira EF, Alves EA, Casati AE, Ferrazini CE, Soares Filho AC, Gamboa RM, et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) in urban areas endemic for visceral leishmaniasis. *J Med Entomol*. 2011;48:2277-84.
- Melhay MO, Gilbert PL, Coma JL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27:403-9.
- Sistema de Informação de Agrovos de Referência. Brasil: Ministério de Saúde; 2008. <http://sis.agrovos.gov.br/brasil/veivis/index.html>.
- Ministério de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral, 2nd edition. Brasília: Ministério de Saúde; 2006.
- Souza RG, Santos JF, Rodrigues PG. Tuleo Almeida Azeite-Ferreira. Casos de leishmaniose visceral registrados no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. *Acta Sci Health Sci*. 2003;29:55-9.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Cidades; 2014. <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/paella.php?lang=&codmun=317000>.
- Instituto Brasileiro de Florestas. Inventário Florestal de Minas Gerais. 2014. <http://www.institutoibef.com.br/pt/ibef/geo/InventarioFlorestal>.
- Kozicki M, Gower J, Beck C, Hubert B, Hubel F. World Map of the Kloppein-Gespe: Climate Classification Applied. *Abstr Int J*. 2006;15:259-63.
- Kowen GM, Barrett BA, Wickremasekera MP, Rajaratna RP, Chitambar Niro S, Ruckler J. Further comments on the ecology of *Lutzomyia* (San Francisco Valley, Minas Gerais, Brazil). *Bull Br Ornithol Club*. 2006;134:205-20.
- Veloso HF, Bergel Filho AJR, Lima JCA. Classificação de vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. *Rev de Janeiro* (BGE); 1991. 123.
- Pagani H, Barata RA, Franqueline J, Silva J, Que ES. PH: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de insetos vetores. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:70-2.
- Guzon C, Barreiros H, Dedeit JF, Falcão AL, Melizangeli D, Ferro C, et al. Propagation of a standard description for Phlebotomine sand flies. *Parasitologia*. 1991;101:27-35.
- Galea IAE. Morphology taxonomic. Classificação de Phlebotomines. In: *Phlebotomines of Brazil*. Edited by Bergel JF, Laimon H. *Rev de Janeiro Fiacruz*. 2003;23-205.
- Mazzoni CB. A proposal of generic and subgeneric subdivisions of phlebotomine sand flies (Diptera: Phlebotomidae) (Phlebotominae) of the world. *Econom News*. 2007;118:251-6.
- Roberts DL, Hsi BS. An index of species abundance for the with mitequito surveillance data. *Environ Entomol*. 1995;100:7-13.
- Pielou E.C. *Mathematical Ecology*. New York: Columbia University Press; 1977. p. 367-69.
- Saracá L, Carvalho GM, Sanguinetti CC, Cavallari DAP, Falcão AL, Andrade Filho JD, Sant'Ana (Diptera: Phlebotomidae) collected in the banks of the Yellow River in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;114:945-6.
- Algoz PD, Simabucaram PVS, Quaresima PF, Coelho R, Trindade GR, Siqueira MS, et al. Ecological aspects of the Phlebotomine fauna (Diptera: Phlebotomidae) in the Sabará indigenous territory, Brazil. *Parasit Vectors*. 2014;7:220.
- Bergel JF, Laimon H. *Biologia das Leishmanias, Phlebotomines do Brasil*. Edited by Bergel JF, Laimon H. *Rev de Janeiro Fiacruz*. 2003. 291-308.
- Andrade Filho JD, Galati EMB, Falcão AL. *Microspis intermedia* (Duf. & Meun, 1912) and *Microspis neta* (Pinto, 1920) (Diptera: Phlebotomidae) (Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;118:468-72.
- Saracá L, Carvalho GM, Gonçalo CM, Quaresima PF, Lima JC. Natural infection of *Lutzomyia* species and *Lutzomyia* subgenus (Diptera: Phlebotomidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46:1759-65.
- Carvalho GM, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACM, Gonçalo CM. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a semiurbanized area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:407-14.
- Martins C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Santos L, Ferreira AI, et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Phlebotomidae) and leishmaniasis infections in Galiléia Park, Chapadão, Brazil. *J Med Entomol*. 2010;47:1212-9.
- Brade RP, Neves WL, Freije AA, Falcão AL, Andrade Filho JD. The parasitological sand fly fauna (Diptera: Phlebotomidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Altim Paraisópolis, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;161:478-82.
- Que ES, Franqueline J, Silva J, Monteiro RB, Barata MP, Gonçalves CM, et al. Phlebotomines (Diptera: Phlebotomidae) from forest and urbanization (segmented) in estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:4-52.
- Monteiro EM, Franqueline J, Costa HJ, Costa EC, Saracá RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: estudo de *Belitzomyia* e infecção cutânea em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:547-52.
- Ferreira CP. Novas observações sobre a biologia de *Belitzomyia* em condições naturais (Diptera: Phlebotomidae). *Arq Hig Saude Publica*. 1960;25:209-21.
- Shaw SLA, Guillory N. Observações sobre *Calusia* em Jacutinga, Bahia II - Alguns dados sobre as *Phlebotomina* (conspicua), o principal transmissor. *Rev Bras Med Vet Trop*. 1969;21:541-61.
- Mazzoni CB, Day JL, Brady PG. Interactions between *Lutzomyia intermedia* and both its vector and its victims, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:728-6.
- Gonçalo CM, de Silveira ES, de Fazzin MB, de Souza MCA, Pacheco BS, Que ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 2002;61:143-50.

32. Galati EAB, Nunes VLB, Cristóvão G, Brinde PC. Aspectos de comportamento de larvas de *Phlebotomus* (Diptera: Phlebotomidae) em foci de leishmaniose visceral e tegumentar no Sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Entomol Trop*. 2012;52:235-61.
33. Oliveira AC, Galati EAB, Oliveira G, Oliveira GH, Espindola MC, Diniz MC, et al. Abundance of *Leishmania longipalpi* (Diptera: Phlebotomidae) *Phlebotomus* and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;101:869-74.
34. Azevêdo GS, Oshiro E, Leite MC, Mello AV, Ribeiro LM, Moraes MLP, et al. *Phlebotomus sandflies* (Diptera: Phlebotomidae) at rural settlements in the municipality of Gouveia, state of Mato Grosso, Brazil. *Revista Bras Med Trop*. 2012;46:437-45.
35. Ribeiro LM, Oshiro EF, Souza DA, Ferebento NF, Verone NV, Moraes MLP, et al. Biological aspects of immature stages of *Phlebotomus whitmorei* (Diptera: Phlebotomidae) (Diptera: Phlebotomidae) in laboratory conditions. *Rev Bras Entomol*. 2015;59:10-5.
36. Galati EAB, Moraes AV, Andrade BMC, Corrêas CA, Ribeiro EFW. *Phlebotomus* (Diptera: Phlebotomidae) in the speleological province of the Itaipu Valley 2. Parque Estadual do Açu (Itaipu) (PE Açu), São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Entomol*. 2012;56:473-87.
37. Corwin AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos de leishmaniose tegumentar americana 7 - Capacidade vectorial de *Phlebotomus* em ambiente forestal próximo do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Itaipu, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pùb*. 1999;23:65-82.
38. Wanderley OS, Santos-Neto LG, Lazzari AL. Ecology of *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Phlebotomidae) in Brazilian Atlantic forest. *Revista Bras Med Trop*. 2001;36:255-60.
39. Geraldo GM, Brade IP, Barros MNE, Aires PLS, Jordão ALA, Brade HA, et al. Ecological Aspects of *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Phlebotomidae) from a Cave of the Speleological Province of Barro Alto, PLS ONE. 2013;8:77136.
40. Corwin AC, Balduino EX, Santos EF, Galati EAB. Estudo experimental de freqüência de *Phlebotomus* a ectoparasitas artificiais com referência espacial a *Psychodogus* *intermittens*. *Rev Saúde Pùb*. 1980;14:60-66.
41. Corwin AC, Balduino EX, Santos EF, Galati EAB. Aspectos ecológicos de leishmaniose tegumentar americana - 5. Observações naturais sobre o ritmo diário de atividade de *Psychodogus* *intermittens* em ambiente florestal e entredoméstico. *Rev Saúde Pùb*. 1985;19:25-30.
42. Souza HA, Andrade-Cadillo CA, Wale M, Barajal EF. The *Phlebotomus* *uscidifly* (Diptera: Phlebotomidae) fauna of two Atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:319-24.
43. Mayo JC, Casanova C, Maccioni LM, Pignatti MG, Barajal E, Galati EAB, et al. *Phlebotomus* (Diptera: Phlebotomidae) de área de transição de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itapava, região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Bras Med Trop*. 1999;21:339-45.
44. Andrade Filho EJ, Silveira MB, Andrade WA, Brade IP, Falcão AL. *Phlebotomus* (Diptera: Phlebotomidae) de área de transição. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2001;34:223-9.
45. Loda CF, Silva DA, Galati EAB. *Phlebotomus* fauna (Diptera: Phlebotomidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southwestern Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:281-5.
46. Saraiva L, Andrade-Filho EJ, Falcão A, Geraldo DAA, Souza CM, Freitas OJ, et al. *Phlebotomus* fauna (Diptera: Phlebotomidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of localized foci as determined by spatial analysis. *Acta Trop*. 2011;117:157-61.
47. Ruedenroth BW, Saraiva L, Teixeira Neto RGA, Aires PLS, Sanguinetti C, et al. Study of sand flies (Diptera: Phlebotomidae) in rural and transition leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. *Acta Trop*. 2011;125:292-6.
48. Geraldo GM, Cordeiro GM, Falcão A, Andrade-Filho EJ. Study of *phlebotomus* sand flies (Diptera: Phlebotomidae) in a rural in a leishmaniasis-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte. *Brazil J Med Entomol*. 2010;47(6):921-6.
49. Latorre B, Barajal EF. Autonomy, biogeography and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):1-27.
50. Neto FD, Riquelme MM, Simões-Junior PM, Corrali GH, Quaresima JP, Cordeiro CAM. Molecular detection of *Leishmania* in *Phlebotomus* sand flies (Diptera: Phlebotomidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Sabá (distrito indígena) (Brazil). *Braz J Parasitol*. 2015;109:1223336.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

