

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

PIETRA LEMOS COSTA

COMPORTAMENTO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS,
COM ÊNFASE EM *Lutzomyia longipalpis*, EM ÁREA
ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO
MUNICÍPIO DE PASSIRA, AGRESTE DE PERNAMBUCO

RECIFE

2011

PIETRA LEMOS COSTA

**COMPORTAMENTO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS, COM ÊNFASE EM
Lutzomyia longipalpis, EM ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL
NO MUNICÍPIO DE PASSIRA, AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, PhD

**RECIFE
2011**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Costa, Pietra Lemos.

Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral, Agreste de Pernambuco. — Recife: P. L. Costa, 2011.

92 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.

1. Leishmaniose visceral - Prevenção e controle. 2. *Leishmania infantum* - Parasitologia. 3. Reservatórios de doenças. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

PIETRA LEMOS COSTA

**COMPORTAMENTO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS, COM ÊNFASE EM
Lutzomyia longipalpis, EM ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL
NO MUNICÍPIO DE PASSIRA, AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

Dra. Milena Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Instituto Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho àqueles que me deram sustento, que me alimentaram e me carregaram no colo. Àqueles que abriram portas, que me deram todas as oportunidades, que lutaram pelos meus interesses. Aos meus pais, Murilo e Vânia, que são tudo em minha vida e sempre priorizaram por uma educação de qualidade. Vocês fazem parte deste caminho. O meu profundo OBRIGADA, AMO VOCÊS!!!

Aos meus irmãos, Filipe e Murilo Júnior, pelo apoio e confiança.

Aos meus sobrinhos, Emily e Thales, por todo carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos com muita luz e fé e conduzir minhas vitórias e conquistas.

Ao Dr. Sinval Brandão Filho, meu orientador, pela amizade, disponibilidade, competência e apoio.

A minha mãezona de laboratório, Dr^a. M^a. Edileuza Brito, pela generosidade, conselhos, ensinamentos e valiosas considerações.

A Dr^a. Milena Paiva, por sua doçura, apoio e amizade, sempre se disponibilizando a ajudar.

Ao técnico Fernando José da Silva, pela amizade, cuidado, empenho e dedicação no trabalho de campo.

A Reginaldo Peçanha Brazil (IOC) e José Dilermando Andrade Filho (CPqRR) pelos conselhos e apoio em algumas análises de amostras.

A Ana Lúcia de França Barros, na época deste trabalho, Secretária de Saúde de Agrestina, pelo total apoio em cada passo dado na minha profissão, pelos conselhos de mãe, pela amizade e confiança. Minha vitória também é sua.

Ao meu tio João Alfredo Beltrão, pelo apoio incondicional e preocupação de pai que sempre me foi dada. Obrigada por tudo.

A minha prima Catarina Beltrão, pelo apoio sempre, amizade e preocupação.

A todos os integrantes do Departamento de Imunologia que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte deste curso.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, na figura do Dr. Eduardo Freese, pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

A George Diniz, pelo apoio na análise estatística.

A Vanessa Fitipaldi, Kyldman Thaís e Kamila Gaudêncio, pelo apoio incondicional, preocupação, amizade e divertidos momentos passados.

A Isabele Freitas e Ana Waléria pelo total apoio no processamento dos roedores e pelos excelentes momentos de descontração.

A Aílton e Assis, por todo o suporte no NBA3 e na Sala de Identificação de Flebotomíneos.

A Amílton pelo apoio inicial nas capturas de flebotomíneos.

A Suênia, Sandra e demais integrantes da equipe de Leishmaniose pelo apoio direto e indireto na realização deste trabalho.

A Francisco Gomes, pelo suporte e apoio no biotério de animais (NBA 3).

A amiga e colega da turma de mestrado Ana Virgínia por seu apoio sempre.

A Edson, técnico da esterilização, por todo apoio e boa vontade na esterilização dos materiais.

A todos os colegas de mestrado, pela amizade e convívio ao longo do curso.

A Prefeitura Municipal de Passira, na pessoa de Dr. Miguel Gomes, que me concedeu licença para realização deste estudo, além do acolhimento e apoio incondicional para realização deste trabalho.

As funcionárias da Prefeitura de Passira, Mauricéia e Luana, pelo apoio e presteza em todos os momentos deste trabalho.

Aos agentes de endemias, Bruno, Gilmar, Girdel e Venâncio, pelo apoio nas capturas de flebotomíneos.

A população de Passira, em especial, das localidades de Poço do Pau, Apara, Sítio Borba e Varjada de Cima, pelo acolhimento para realização deste trabalho.

A todos os funcionários da Secretaria Municipal de Saúde de Agrestina que me apoiaram em vários momentos, em especial a Polyana, Suziêlda, Maiara, Alba, André, Hugo e Thiago.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia – LIMP: Mineo, Adriene, Ana Karine, Suellen, Patrícia e Amanda e demais técnicos pelo convívio e apoio, durante as atividades no laboratório.

COSTA, Pietra Lemos. Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia Longipalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral no município de Passira, Agreste de Pernambuco. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, trasmistidos por insetos da família Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Em Pernambuco, a LV vem apresentando importante expansão geográfica. Passira registrou 06 casos de LV humana entre 2002 e 2007 e, 35 casos de LVC entre 2005 e 2009. Este estudo objetivou descrever o comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Passira, Agreste de Pernambuco. Quatro localidades foram selecionadas para o estudo (Apara, Poço do Pau, Sítio Borba e Varjada de Cima). Utilizou-se armadilhas CDC, armadilha de Shannon e armadilha Disney modificada com isca animal (*Galea spixii* e *Rattus rattus*) para coletar os flebotomíneos em diferentes ecótopos. Dos flebotomíneos coletados alguns foram dissecados e o restante foi feito pools com 5 ou 10 exemplares para extração e detecção do parasito através do teste de PCR. Entre agosto/2009 a agosto/2010 foram capturados 24.226 flebotomíneos com armadilha CDC, em diferentes ecótopos. Destes, 23.716 exemplares são de *Lutzomyia longipalpis*. Ademais, foram realizadas capturas com Armadilha de Shannon, na qual se coletaram 373 espécimens de *Lutzomyia longipalpis*, sendo então dissecados 30 exemplares. Verificou-se que de todos os ecótopos trabalhados, o E1 referente ao galinheiro foi o que mais atraiu os flebotomíneos. Três animais (dois *Galea spixii* e um *Rattus rattus*) foram utilizados para captura de flebotomíneos com armadilha Disney modificada, sendo 228 espécimens coletados de *Lutzomyia longipalpis*. Adicionalmente, verificou-se a flutuação da população de flebotomíneos com a variação climática na região, no qual se podem observar picos de flebotomíneos em períodos após a chuva, que correspondeu ao mês de fevereiro. Para detecção de *L. infantum* foram analisadas 628 pools de flebotomíneos, sendo 01 exemplar de *Lutzomyia longipalpis* apresentando positividade. 75% das amostras analisadas de roedores apresentaram positividade para *L. infantum*. Destas, 02 eram de baço, 02 de fígado e 01 de pele do *Galea spixii* e, 01 de baço do *Rattus rattus*. Diante dos casos de LV notificados no município, da abundância de *Lutzomyia longipalpis* nas quatro localidades estudadas, da detecção da infecção natural por *L. infantum* em flebotomíneo desta espécie e, em animais utilizados como isca animal, sugere-se fortemente a importância deste vetor no ciclo de transmissão de LV na região, além do risco de exposição da população local a doença e a necessidade de implantação de ações de vigilância epidemiológica e entomológica, visando medidas mais efetivas de controle e prevenção da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Prevenção e controle. *Leishmania infantum*. Parasitologia. Reservatórios de doenças. Psychodidae. Parasitologia.

COSTA, Pietra Lemos. Behavior phlebotomine fauna, with emphasis on *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area for Visceral Leishmaniasis in Passira municipality, Agreste of Pernambuco. 2011. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted by insects of Phlebotominae family (Diptera: Psychodidae). In Pernambuco, the VL has shown significant geographic expansion. Passira recorded 06 cases of human VL between 2002 and 2007, and 35 cases of VCL between 2005 and 2009. This study aimed describe the behavior of the sandfly fauna, with emphasis on *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area for visceral leishmaniasis in the municipality of Passira, Agreste of Pernambuco. Four locations were selected for the study (Apara, Poço do Pau, Sítio Borba and Varjada de Cima). We used CDC light traps, Shannon traps and traps baited with Disney modified animal (*Galea spixii* and *Rattus rattus*) to collect sand flies in different ecotypes. Some of the sandflies collected were dissected and the remainder was made pools of 5 or 10 copies for extraction and detection of parasites by PCR test. Between August/2009 and August/2010 were captured 24.226 san flies with CDC light traps, in differents ecotypes. Of these, 23.716 specimens are *Lutzomyia longipalpis*. Moreover, there were captured with Shannon trap, in wich collected 373 specimens of *Lutzomyia longipalpis*, and then dissected 30 specimens. It was found that all workd ecotypes, E1 corresponding to henhouse was the most attracted sand flies. Three animals (two *Galea spixii* and one *Rattus rattus*) were used to capture sand flies with Disney trap changed, being 228 specimens of *Lutzomyia longipalpis* collected. Additionally, there was a fluctuation of the population of sand flies with climate variability in the region in which we can observe peaks of sand flies after rain periods, which corresponded to the month of February. For detection of *L. infantum* were analyzed 628 pools of sand flies, and 01 copie of *Lutzomyia longipalpis* was positive. 75% of rodent samples were positive for *L. infantum*. Of these, 02 were spleen samples, 02 liver samples and 01 skin sample of *Galea spixxi* and 01 spleen sample of *Rattus rattus*. Given the reported cases of the municipality in the past and the abundance of *Lutzomyia longipalpis* in the region, may suggest the involvement of this vector in the transmission cycle of VL in Passira. Before the cases of VL reported in the city, the abundance of *Lutzomyia longipalpis* in the four cities studied, the detection of natural infection with *L. infantum* in this sand fly species, and animals used as bait animal, it is strongly suggested the importance of this vector in the transmission cycle of VL in the region, besides the risk of exposure of the local population to disease and the need for implementation of epidemiological monitoring and entomological surveillance measures aiming at more effective control and prevention of disease.

Key-words: Visceral Leishmaniasis. Prevention and control. *Leishmania infantum*. Parasitology. Disease reservoirs. Psychodidae. Parasitology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo	16
Figura 2-	Casos de Leishmaniose visceral por região no Brasil, entre 2000 a 2008	25
Figura 3-	Localização do município de Passira, Pernambuco	36
Figura 4-	Esquematização das capturas de flebotomíneos e análise das amostras de flebotomíneos e roedores	37
Figura 5 -	Mapa dos pontos de coleta de flebotomíneos por localidade e ecótopo	40
Figura 6-	Distribuição dos ecótopos onde eram instaladas armadilhas tipo CDC, em Passira, PE	41
Figura 7-	1. Armadilha de Shannon; 2. Captura manual com capturador de Castro	42
Figura 8-	Armadilha Disney modificada com isca animal (<i>Galea spixii</i> e <i>Rattus rattus</i>)	42
Figura 9-	Caixa de plástico com tampa de metal para acondicionamento de animais	46
Figura 10-	Estante ventilada para acondicionamento dos animais	46
Figura 11-	Câmara de CO ₂ para eutanásia de animais	47
Gráfico 1-	Percentual de flebotomíneos capturados em diferentes ecótopos com armadilha CDC, entre agosto de 2009 e agosto de 2010, no município de Passira, Pernambuco	52
Gráfico 2-	Percentual de flebotomíneos capturados em armadilha CDC entre Agosto/2009 e Agosto/2010, e variação da temperatura, umidade e pluviosidade em Passira, Pernambuco, Brasil	54
Figura 12-	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produto de PCR de amostra de <i>Lutzomyia longipalpis</i> amplificado	55

a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovaní (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostra de DNA de flebotomíneo (1). O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

Figura 13- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, 56 mostrando produtos de PCR de amostras de *Galea spixii* amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovaní (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺⁺ 10ng/μl), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostra de baço e fígado de *Galea spixii* (1 e 2), respectivamente. O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

Figura 14- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, 57 mostrando produtos de PCR de amostras de *Galea spixii* e *Rattus rattus* amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovaní (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (λ + Hind III) (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺⁺ 10ng/μl), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostra de pele (1 e 4), baço (3 e 5) e fígado (6) de *Galea spixii*, baço (2) e lesão (7) de *Rattus rattus*, respectivamente. O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição das espécies de flebotomíneos coletadas com armadilha CDC no município de Passira, entre agosto/2009 e agosto/2010.	51
Tabela 2-	Total das espécies capturadas em Armadilha de Shannon utilizando capturador de Castro, no período de estudo em Passira, Pernambuco	52
Tabela 3-	Concentração de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> capturados por localidade, em Passira, Pernambuco.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

L. infantum – *Leishmania infantum*

L. longipalpis – *Lutzomyia longipalpis*

L. evandroi – *Lutzomyia evandroi*

L. lenti – *Lutzomyia lenti*

L. sallesi – *Lutzomyia sallesi*

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

IDR – Intradermorreação de Montenegro

PCR – Reação em cadeia de polimerase

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

LVC – Leishmaniose visceral canina

LVH – Leishmaniose visceral humana

DNA - Deoxyribonucleic Acid

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco

TE - Tris EDTA

HCl - Ácido Clorídrico

KCl - Cloreto de Potássio

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

NBA - Nível de Biossegurança Animal

kDNA - Kinetoplastic Deoxyribonucleic Acid

pb - Pares de base

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral	15
1.2 Aspectos históricos	17
1.3 Hospedeiros reservatórios	18
1.4 Flebotomíneos: posição sistemática, biologia e ecologia	19
1.5 Transmissão	21
1.6 Ciclo de vida	22
1.7 Fatores de Risco	23
1.8 Epidemiologia	24
1.9 Manifestações Clínicas	26
1.10 Diagnóstico	27
1.10.1 <u>Diagnóstico laboratorial</u>	27
1.10.2 <u>Diagnóstico imunológico e parasitológico</u>	28
1.10.3 <u>Diagnóstico molecular</u>	28
1.11 Tratamento	29
1.12 Medidas de Controle	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 PERGUNTA CONDUTORA	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo Geral	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5 METODOLOGIA	36
5.1 Desenho do estudo	36
5.2 Área de estudo	36
5.3 Fluxograma de trabalho	37
5.4 Flebotomíneos	38
5.4.1 <u>Captura de flebotomíneos</u>	38
5.4.2 <u>Dissecção de flebotomíneos</u>	43
5.5 Dados meteorológicos	43
5.6 Abordagem molecular em flebotomíneos	43

5.6.1 <u>Extração e purificação de DNA dos exemplares de flebotomíneos</u>	43
5.6.2 <u>Amplificação do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> por PCR</u>	44
5.7 Isca animal	45
5.8 Eutanásia dos animais	47
5.9 Diagnóstico	47
5.9.1 <u>Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta</u>	47
5.9.2 <u>Abordagem para o diagnóstico molecular da infecção por <i>Leishmania</i> spp. em roedores</u>	48
5.9.2.1 <u>Extração e purificação de DNA de roedores</u>	48
5.9.2.2 <u>Amplificação do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> por PCR</u>	48
5.10 Análise estatística	49
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
7 RESULTADOS	51
7.1 Captura de flebotomíneos	51
7.2 PCR específica para o complexo Donovaní (<i>Leishmania infantum chagasi</i>) de amostras de flebotomíneos	54
7.3 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta	55
7.4 PCR específica para o complexo Donovaní (<i>Leishmania infantum chagasi</i>) de amostra de roedores	56
7.4.1 <u>Amostra de baço, fígado, pele e lesão de <i>Galea spixii</i> e <i>Rattus rattus</i></u>	56
8 DISCUSSÃO	58
8.1 Captura de flebotomíneos	58
8.2 Abordagem molecular em flebotomíneos	62
8.3 Diagnóstico parasitológico e molecular em roedores	63
9 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais	83
ANEXO B – Termo Aditivo do Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais	84
ANEXO C - Autorização para atividades com finalidade científica	85
APÊNDICE A – artigo publicado	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários morfológicamente similares do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que constitui um importante problema de saúde pública em pelo menos 88 países, sendo 16 países desenvolvidos e 72 países em desenvolvimento, com cerca de 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de contrair alguma das várias formas clínicas que as leishmanioses podem apresentar (DUJARDIN, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Esta afecção apresenta uma incidência anual de dois milhões de casos das diferentes formas clínicas, sendo 1,5 milhões de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e 0,5 milhões de casos de Leishmaniose Visceral (LV) que representa a forma mais grave da doença com aproximadamente 59 mil óbitos ao ano, sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda em número de óbitos, perdendo apenas para a malária (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

A LV apresenta ampla distribuição mundial com 90% dos casos ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Nepal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Na América Latina, estende-se desde o México até a Argentina, sendo o Brasil com concentração de 90% dos casos humanos registrados no Novo Mundo (LAINSON; RANGEL, 2005) (Figura 1).

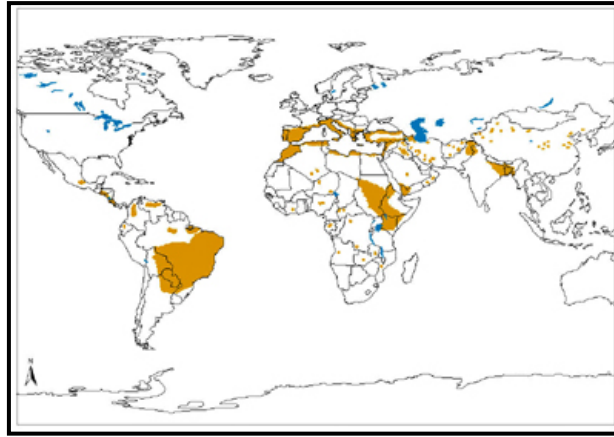


Figura 1- Distribuição da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2011)

Nas Américas, a LV é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987; SHAW, 1994). O agente etiológico da LV é a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo transmitida por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) é a principal responsável pela transmissão, porém outras espécies podem estar envolvidas (CARVALHO et al., 2007; LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas últimas duas décadas, a transmissão da LV, no Brasil, vem sofrendo um processo de urbanização, o que indica a transição da doença de características quase totalmente rurais para uma maior distribuição em áreas urbanas (MIRANDA, 2008). Este processo vem sendo observado especificamente desde o início dos anos 80, no qual epidemias foram registradas em áreas urbanas da região Nordeste, como Teresina, Natal, São Luís e Fortaleza, além de outras regiões como, Belo Horizonte, Campo Grande, Rio de Janeiro, e Araçatuba (SILVA et al., 2007).

A crescente urbanização, associada à alteração no ambiente natural e a presença do vetor da *L. infantum*, tem favorecido o aumento da incidência de LV humana no Brasil (LUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001). Fatores como condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são importantes na epidemiologia da doença. Essas condições podem colaborar para que a LV seja perpetuada em ambientes periurbanos e urbanos, acometendo aglomerados populacionais com baixo nível sócio-econômico (NASCIMENTO et al., 2005).

As alterações antrópicas, contribuíram para a dispersão de animais silvestres que servem como fonte de alimentação aos insetos e ocasiona a adaptação de várias espécies a diferentes ecótopos (GOMES et al., 1989).

A proximidade do homem às áreas florestais e a criação de animais domésticos atraem uma grande quantidade de espécies de flebotomíneos ao peridomicílio. Ao serem atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e a presença desses pode contribuir para a manutenção do ciclo de transmissão e serem o elo entre animais doméstico e a população (MISSAWA et al., 2008).

A sintomatologia desta zoonose é similar em cães e seres humanos. Nos homens, a forma clássica caracteriza-se por apresentar sintomas e sinais de doença crônica. Dentre os sintomas, podemos citar febre ondulante, fadiga, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS et al., 2007; MANNA et al., 2006). Devemos considerar, contudo, que tanto o surgimento da doença quanto sua evolução são consequências das interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA et al., 2006). No cão, os sintomas mais comuns são lesões cutâneas em diversas partes do corpo, com tempo de incubação variável, com média de 3 a 7 meses. A infecção pode ocorrer ainda de maneira oligossintomática e assintomática (BRASIL, 2006; PAIVA-CAVALCANTI, 2008).

1.2 Aspectos históricos

A leishmaniose visceral foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada “ponos” ou “hapoplinaikon”. Em 1869, recebeu o nome “kalajwar” que, na Índia, quer dizer febre negra ou “kala-azar” devido ao discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981). William Leishman, em 1900, identificou um protozoário em amostra de baço de um soldado que veio a óbito na Índia, em decorrência de uma febre conhecida no local como “febre Dum-Dum” ou “Kala-azar”. Quase que simultaneamente, Donovan identificou o mesmo parasito em amostra de outro paciente. Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar (FAUST; RUSSEL; JUNG, 1974).

Na América do Sul, o primeiro caso de LV foi relatado por Migone em 1913, em material de necropsia de paciente que havia contraído a doença no Estado do Mato Grosso

(LAINSON, 2010). No Brasil, Penna, em 1934, relatou os primeiros achados do parasito, em lâminas de cortes histológicos de fígado de indivíduos que foram a óbito com suspeita de febre amarela (PENA, 1934). Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (DEANE, 1956).

Em Pernambuco, o primeiro relato da doença ocorreu em 1934, quando Penna descreveu entre material constituído por 47.000 cadáveres viscerectomizados um caso positivo. A partir de então, Figueiredo (1936), descreve dois casos suspeitos sem, contudo ter sido possível evidenciar a presença dos parasitos em material de punção hepática e esplênica (HUGGINS, 1973). Em 1938, Chagas relata a ocorrência de um gato parasitado no Estado de Pernambuco (OLIVEIRA, 1960). Já Tavares (1941), comunicou o primeiro caso clínico da doença, tratando-se de uma criança de dois anos proveniente de Jaboatão dos Guararapes (HUGGINS, 1973; OLIVEIRA, 1960). No ano seguinte, Albuquerque; Brito; Moraes (1942) realizaram um inquérito populacional sobre a Doença de Chagas, e constataram dois casos de LV humana no município de Exu. Tavares (1945) divulga mais um novo caso de LV oriundo de uma criança de quatro anos proveniente de Cachoeira de Itaparica diagnosticada através de punção esplênica (HUGGINS, 1973).

1.3 Hospedeiros reservatórios

Em locais no qual a LV é endêmica, o cão (*Canis familiaris*), tem sido incriminado como hospedeiro doméstico e principal reservatório de *L. infantum* nos centros urbanos (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Os hospedeiros silvestres até o momento conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (DEANE, 1956); e *Cerdocyun thous* no Mato Grosso do Sul (MELLO et al., 1988), Pará (LAINSON et al., 1990) e em Minas Gerais (SILVA et al., 2000). *L. infantum* foi isolada de em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003). No Velho Mundo, como hospedeiros silvestres, têm sido descritos ainda o chacal, *Canis aureus*, o lobo, *Canis lupus*, e a raposa, *Vulpes vulpes*, encontrados em áreas rurais remotas (LAINSON et al., 1987).

O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos. Os cães são considerados os mais importantes

reservatórios domésticos e talvez os responsáveis pela grande mudança no perfil epidemiológico desta doença (MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994), que inicialmente estabeleceu-se em áreas rurais e periurbanas e que recentemente vem aumentando significativamente seu número de casos nos grandes centros urbanos, com o surgimento de focos em áreas até então indenes. O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (DEANE; DEANE, 1954). Entretanto, é provável que em algumas situações específicas, existam outras fontes de infecção e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão (DEANE; DEANE, 1955a; 1995 b).

A presença de fragmentos de DNA de *L. infantum* foi relatada em um exemplar do rato d'água, *Nectomys squamipes* em área de Mata Atlântica do estado de Pernambuco através da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a).

1.4 Flebotomíneos: posição sistemática, biologia e ecologia

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos pertencentes à subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, a qual é composta por seis gêneros: *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987 no Velho Mundo e *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1984 no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* é o maior e de mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, um pouco mais de 400 são de *Lutzomyia*. O gênero é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, sendo que suas fases larvais desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, enquanto os adultos de ambos os sexos, se alimentam de açúcares de plantas. Somente as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o alimento importante para a maturação dos ovos (FORATTINI, 1973). Embora se conheça os hábitos alimentares das formas imaturas, pouco se sabe sobre os

criadouros naturais das larvas de flebotomíneos no Novo Mundo. As formas imaturas têm sido encontradas em ambientes domésticos (fendas de chão e paredes, porões de casas e construções abandonadas), peridomésticos (tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras, aterros) e silvestre (cavernas, formigueiros, raízes tubulares, toca de roedores). O conhecimento mais específico desses sítios de criação pode facilitar o controle desses psicodídeos (FELICIANGELI, 2004).

No Brasil, a fauna de flebotomíneos é composta por mais 230 espécies (GALATI, 2003), representando uma das faunas mais bem estudadas em todo o mundo. Isto se torna importante para o subsídio de informações base para desenvolvimento de políticas públicas de saúde voltadas para o programa de controle da LV.

Diversos estudos sobre flebotomíneos vêm sendo desenvolvidos, no Estado de Pernambuco, fornecendo novos conhecimentos na ecoepidemiologia das leishmanioses no nordeste do Brasil. Um total de 37 espécies de flebotomíneos em torno de 14 gêneros tem sido relatado previamente no estado, entretanto seis espécies necessitam de confirmação. A diversidade da fauna de flebotomíneos é pequena quando comparados com a variedade de espécies de outros estados do Nordeste como, Maranhão e Bahia, e é mais diversa do que os estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (DANTAS-TORRES et al., 2010).

Pernambuco é representado por vários biomas, no entanto, a Mata Atlântica e a Caatinga são os principais. Apesar dos limites nos dados publicados, sabe-se que um vasto número de espécies de flebotomíneos é encontrado nestas regiões. Entretanto, a diversidade das espécies de flebotomíneos na Caatinga parece ser subestimada. De fato esta região é um ambiente hostil para espécies que não são adaptadas para sobreviver em condições semi-áridas. *L. longipalpis* é adaptado a tais condições e, por esta razão a LV é amplamente distribuída no interior e nas regiões do semi-árido (DANTAS-TORRES et al., 2010). Mesmo com vários estudos sendo realizados no estado, existe uma escassez de trabalhos em torno de *L. longipalpis*, particularmente no que diz respeito a sua distribuição geográfica e sazonal, hábitos alimentares e reprodução, sendo estes levantamentos relevantes para se definir melhores estratégias de controle vetorial (DANTAS-TORRES, 2006e).

1.5 Transmissão

A principal forma de transmissão é através da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, conhecidos por flebotomíneos (SANTOS et al., 1998), dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo e, *Lutzomyia*, no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990). Entre os diversos flebotomíneos que têm sido incriminados e/ou comprovados como vetores de leishmânias, destacam-se *L. longipalpis*, e recentemente *L. cruzi*, vetor incriminado na transmissão de LV nos municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (BARATA et al., 2005; GALATI et al., 1997), e no município de Jaciara, Mato Grosso (MISSAWA et al., 2011) no Novo Mundo e, *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi*, no Velho Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990, 1999). Outras espécies podem abrigar, mesmo que experimentalmente, a *L. infantum*, mas sem impacto sobre a transmissão da doença, sendo considerados vetores permissivos, pois há evidências consistentes sobre a especificidade de vetores para determinadas espécies de *Leishmania* (LAINSON; SHAW 1998; SHERLOCK 1997; VOLF; MYSKOVA, 2007).

Outros modos de transmissão têm sido considerados (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a). Entre humanos, por exemplo, existe a possibilidade de transmissão por meio do compartilhamento de seringas infectadas entre usuários de drogas (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003), transplante de órgãos (BASSET et al., 2005), transfusão sanguínea (MATHUR; SAMANTARAY, 2004), transmissão sexual (SYMMERS, 1960) e congênita (BOEHME et al., 2006; PAGLIANO et al., 2005).

Entre cães foi demonstrada a transmissão por meio de transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006). A via transplacentária é possível, embora seja pouco frequente (ROSYPAL; LINDSAY, 2005). Além disso, existe a possibilidade de transmissão através de outros artrópodes, como pulgas e carrapatos (DANTAS-TORRES, 2006b, 2006c). Apesar dos mesmos (*Rhipicephalus sanguineus*) já terem sido encontrados naturalmente infectados por *L. infantum*, no Brasil, são necessários estudos mais acurados para comprovar o verdadeiro papel destes na epidemiologia da leishmaniose canina (DANTAS-TORRES, 2006b, 2006c).

1.6 Ciclo de vida

O ciclo de vida do protozoário é intracelular, com a localização e multiplicação dentro dos macrófagos, sendo esta forma denominada amastigota. Estas ao serem ingeridas pelo flebotomíneo, através da alimentação sanguínea, se transformam e se multiplicam em promastigotas no intestino médio. As promastigotas sofrem intensa multiplicação dentro da luz intestinal, transformam-se em formas paramastigotas que colonizam diferentes partes do trato digestivo dos insetos. Em seguida diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas que são as forma infectantes (SACKS; SILVA, 1987). A partir da inoculação destas formas na pele, inicia-se uma interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro que determinará a expressão clínica da leishmaniose. Diversos fatores do sistema imunológico são ativados, mas a resposta imune celular, específica para *Leishmania*, tem papel determinante no controle da infecção. As alterações no organismo, sequenciais a presença do parasito, dependem da infectividade e antigenicidade da *Leishmania* e da imunidade e resistência já existentes ou desenvolvidas pelo hospedeiro após a infecção (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Os flebotomíneos, assim como muitos outros insetos, digerem as proteínas do sangue produzindo proteases que são secretadas na luz do intestino médio. A susceptibilidade da *Leishmania* à digestão dentro do intestino é específica do estágio de desenvolvimento do parasito, as formas em estágios intermediários são extremamente susceptíveis à morte pelas enzimas digestivas. Após um período de um e quatro horas da ingestão do sangue ocorre o início da formação de uma matriz peritrófica, constituída por componentes secretados pelas células do epitélio intestinal. Formam-se um denso bolo alimentar dentro do intestino médio que funciona como uma barreira à difusão das enzimas digestivas atuando como um filtro seletivo. As formas promastigotas podem resistir às atividades das enzimas presentes no intestino médio do inseto no momento da digestão sanguínea, escapar da matriz peritrófica, aderir ao epitélio intestinal, completar o ciclo de vida dentro do inseto vetor e desenvolver e se diferenciar em formas infectivas. Essas barreiras naturais existentes dentro do flebotomo vão conduzir a refração ou a susceptibilidade do inseto à infecção, fatores estes que irão determinar a competência vetorial do inseto (PIMENTA; SECUNDINO; BLANCO, 2003).

A doença é transmitida ao hospedeiro mamífero quando fêmeas de flebotomíneos inoculam a forma promastigota metacíclica (infectante). Estas são liberadas na epiderme do

hospedeiro e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior do fagolisossoma dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, ficam desvitalizados e rompem-se liberando essas formas, que serão, num processo contínuo, fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário principalmente baço, medula óssea e placas de Peyer (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

1.7 Fatores de Risco

As leishmanioses, de forma geral, apresentam uma forte relação com a pobreza. As precárias condições de moradia, a falta de saneamento básico e ambiental, além da proximidade com criações de animais de produção, aumenta o risco de exposição para flebotomíneos vetores e, por conseguinte, aumenta o risco de infecção. Além disso, fatores como a má nutrição e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), podem aumentar o risco de adoecimento e a severidade da doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

A presença de determinados animais foi vista como possíveis fatores de risco para transmissão de LV. Em alguns focos, a presença de cães dentro ou nas proximidades das casas pode estar associada à infecção humana (CUNHA et al., 1995). A presença de outros reservatórios, como o gambá-de-orelha-preta (*Didelphis marsupialis*), no peridomicílio também tem sido apontada como um fator de risco (CABRERA, 1999). Alexander et al. (2002) demonstraram que a galinha pode ser um fator de risco na manutenção de vetores próximos as habitações, entretanto a mesma não consegue sustentar infecções por *Leishmania*, sendo refratária, pois várias características fisiológicas incluindo a temperatura corporal evitam o parasitismo destes animais pela leishmânia.

Foi demonstrado que a presença de bovinos podem aumentar (BERN et al., 2007; BERN; COURTENAY; ALVAR, 2010) ou diminuir o risco para transmissão de LV no sul da Ásia (SAHA et al., 2009).

Além da presença de animais, outros fatores podem ser citados, como observado por Cesse et al. (2001), no município de Petrolina, Pernambuco, no qual demonstrou-se que a organização do espaço urbano pode ter grande influência na expansão da doença. Moreno et

al. (2005) verificaram que a falta de coleta de lixo pelo sistema público, o lixo não estocado ou depositado fora das habitações, áreas de erosão na vizinhança, tempo de exposição fora das casas entre 18:00-22:00h em locais com a presença do vetor e a presença de aves, aumentam o risco a infecção por *L. infantum*.

1.8 Epidemiologia

A leishmaniose visceral possui uma ampla distribuição mundial, sendo encontrada nas Américas, África, Sul da Europa, Ásia e Oriente Médio. Nas Américas, ocorre desde o México até a Argentina, com o Brasil contribuindo com 90% dos casos do continente (LAINSON; RANGEL, 2005; MISSAWA et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a LV é considerada um problema de saúde pública mundial, sendo registrados anualmente 500 mil novos casos, com 59 mil óbitos. No Brasil, a LV vem apresentando um elevado número de casos em períodos médios a cada cinco anos, podendo ser observado diferenças no comportamento epidemiológico da doença de acordo com a presença da mesma nas localidades de origem, por exemplo, entre estados e municípios (BRASIL, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde (2010), foram registrados casos autóctones, no Brasil, em 20 Unidades Federadas de quatro regiões. Apesar do maior número de casos ocorrerem na região Nordeste, ao analisar a série histórica pode-se observar uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008. A doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (Figura 2). O gênero masculino e crianças menores de 10 anos são os mais acometidos por esta infecção, com 61,9% (2.383/3.852) e 53,7% (2.068/3.852), respectivamente. Em 2008, foram realizadas 2.996 internações por LV, com média de permanência hospitalar de 14 dias (BRASIL, 2010).

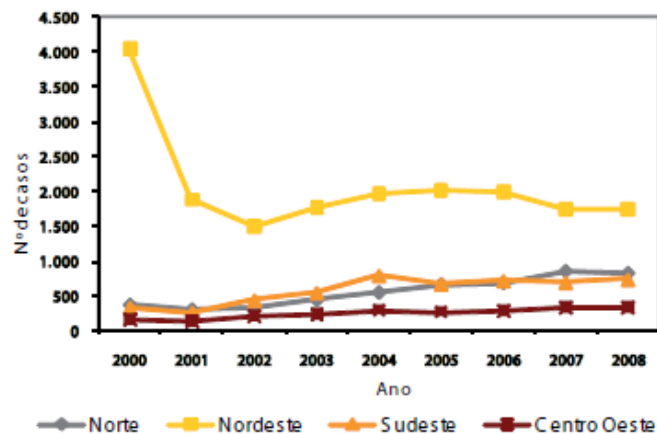


Figura 2 - Casos de Leishmaniose visceral por região no Brasil, entre 2000 a 2008
Fonte: Brasil (2010)

Em Pernambuco, em trabalho pioneiro, Pereira et al. (1985) descreveram alguns aspectos da epidemiologia da LV no estado, durante o período de 1934 a 1984. Neste período, de um total de 336 casos registrados no Estado, 68,5% eram crianças menores de nove anos, concentrados nos municípios do Sertão (64,8% dos casos). Os municípios da Região Metropolitana do Recife (RMR) e da Zona da Mata também se destacaram, com uma parcela de 33,5% dos casos.

Na década de 90, Pernambuco apresentou importante expansão geográfica. Apesar de seu histórico endêmico no Sertão pernambucano, a maioria dos casos de notificações em humanos na década de 90 ocorria na região Agreste. De acordo com Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006d), essa concentração de casos no Agreste pernambucano originou a formação de um cinturão de municípios com LV ao redor de Caruaru. Ainda neste mesmo estado, a LV apresentou-se bastante expressiva, no período de 2000 a 2008, com um total de 1.350 casos confirmados e 86 óbitos (BRASIL, 2009).

Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006a) sugeriram que diversos fatores podem ter contribuído para a disseminação da doença em Pernambuco. Dentre estes, o intenso fluxo migratório intermunicipal, sobretudo do interior do estado para a Região Metropolitana do Recife, ou no sentido inverso, permitindo tanto a introdução do agente causador da LV em áreas livres, quanto à inserção de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas. Além disso, muitas destas famílias se estabelecem na periferia das cidades de médio e grande porte, formando aglomerados densamente povoados que apresentam precárias condições de infraestrutura e saneamento básico.

O ciclo zoonótico da LV, em Pernambuco, encontra-se estabelecido em áreas periurbanas e urbanas, como nos municípios de Petrolina (CESSE et al., 2001) e Paulista (DANTAS-TORRES; ALMEIDA; BRANDÃO-FILHO, 2005). Contudo, nas áreas rurais, onde as precárias condições de vida da população são importantes determinantes do processo saúde-doença, assim como em áreas urbanas e periurbanas, a LV permanece como uma doença negligenciada, acometendo principalmente crianças (SILVA; VASCONCELOS, 2003), sobretudo as desnutridas (QUEIROZ; ALVES; CORREIA; 2004).

1.9 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da leishmaniose são variáveis e dependem da associação entre fatores intrínsecos do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro (PEARSON; SOUZA, 1996).

A LV é considerada uma doença espectral, conhecida como calazar, esplenomegalia tropical, febre dundun, dentre outras, cujas apresentações clínicas variam de formas assintomáticas, na qual o indivíduo não apresenta evidências de manifestações clínicas, até o quadro clássico da doença que é caracterizado pela presença de febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, além de linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia e, menos frequentemente, tosse seca e diarreia. Os sinais e sintomas de desnutrição se desenvolvem com a progressão da doença, incluindo edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas (BADARÓ et al., 1986). A LV é uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço, medula óssea e tecido linfóide do intestino, podendo levar o hospedeiro à morte (HANDMAN, 2000).

Podem ser observados em humanos, porém em menor frequência, glomerulonefrites e lesões tubulointersticiais, provavelmente como uma expressão de doença por imunocomplexos, ocorrendo também na malária e esquistossomose. Na maioria dos casos, apresenta uma glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial e, em decorrência das lesões renais, ocorrem distúrbios de sua função, podendo ser observado albuminúria e hematúria (PRASAD; SEM; GANGULY, 1991).

Nos cães a doença apresenta um amplo espectro de formas clínicas, tendo uma evolução lenta e início insidioso (BLAVIER et al., 2001; BRASIL, 2006; FEITOSA et al.,

2000) e deve ser investigada quando estiverem presentes alguns dos seguintes sinais clínicos: alopecia, úlcera cutânea, perda de peso, esplenomegalia, linfadenomegalia e onicogribose, nódulos de ulcerações (mais frequentes nos bordos das orelhas), hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia.

1.10 Diagnóstico

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de LV. O diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasito através de métodos parasitológicos. O diagnóstico clínico é bastante complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes na área onde incide LV como, por exemplo, esquistossomose, tuberculose miliar, febre tifóide, malária e forma aguda da doença de chagas, brucelose, mononucleose, hepatite, histoplasmose, sarcoidose, leucemia, toxoplasmose, infecções intestinais (GONTIJO; MELO, 2004; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Por este motivo, os exames laboratoriais possuem um importante papel no auxílio do diagnóstico da LV.

1.10.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LV é dado pela demonstração das formas amastigotas. Esta pesquisa pode ser feita em material de medula óssea, pele, fígado, baço e linfonodo (ARTAN et al., 2006). Devido à carência de profissionais para a realização do diagnóstico de LV, muitos casos são notificados meramente por critérios clínicos e epidemiológicos (BRASIL, 2006).

Os exames complementares de indivíduos com LV evidenciam anemia, geralmente pouco expressiva, com hemoglobina acima de 9g/dl, hiperglobulinemia, trombocitopenia, leucopenia e inversão da albumina/globulina. As alterações bioquímicas podem estar

presentes e incluem elevação dos níveis das aminotransferases, das bilirrubinas e aumento discreto dos níveis de uréia e creatinina (BRASIL, 2006).

1.10.2 Diagnóstico imunológico e parasitológico

No Brasil, os exames imunológicos utilizados, são a imunofluorescência indireta (RIFI), os ensaios imunoenzimáticos. O resultado da RIFI é expresso em diluições, sendo considerados soros positivos a fluorescência do parasito na diluição 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se solicitação de uma nova amostra em 30 dias. A Intradermorreação de Montenegro (IDR) é sempre negativa durante a progressão da doença e, não deve ser utilizada para o diagnóstico. Este exame torna-se positivo após a cura clínica na maioria dos pacientes em um período de seis meses a três anos após o término do tratamento (BRASIL, 2006).

O diagnóstico parasitológico mais importante é a punção aspirativa esplênica, método de maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasita, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e aspiração de linfonodos. Devido o procedimento ser mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea. O material aspirado deverá ser examinado através da pesquisa direta, na qual é depositada uma gota do aspirado em uma das extremidades da lâmina para visualização das formas amastigotas do parasita, ou poderá ser tentado isolamento em meio de cultura (*in vitro*, isolamento em animais susceptíveis, *in vivo*) (BRASIL, 2006).

1.10.3 Diagnóstico molecular

Com o advento da biologia molecular várias metodologias têm sido desenvolvidas (SUNDAR; RAI, 2002). A hibridização de DNA, por exemplo, apresenta alta sensibilidade (LOPEZ et al., 1988). Porém, o processo de hibridização é um pouco complexo, limitando o seu uso na rotina de diagnóstico (SUNDAR; RAI, 2002).

A PCR (reação em cadeia da polimerase) tem sido extensivamente utilizada, sendo considerada uma ótima ferramenta no diagnóstico molecular da LV, através da pesquisa do

DNA do parasita em materiais diversos (CORTES et al., 2004; FISSORE et al., 2004; MICHALSKY et al., 2011).

Alta sensibilidade e especificidade, capacidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, além de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens irrefutáveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

Além de estudos clínicos, a PCR tem sido uma ferramenta importante em estudos epidemiológicos, na tentativa de incriminar animais silvestres e domésticos como hospedeiros ou reservatórios da doença, além de detectar a presença do parasito em insetos (MICHALSKY et al., 2011).

Recentemente, a PCR apresentou um expressivo avanço em sua tecnologia, que é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Esta é capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. A qPCR, vêm sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de cães e de humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (FRANCINO et al., 2006; MORTARINO et al., 2004;).

1.11 Tratamento

No Brasil, os compostos antimoniais, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Dois anos após, a droga só foi utilizada no tratamento da LV, na Itália. Os derivados pentavalentes foram introduzidos na década de 40 e, desde então, têm sido considerados drogas de primeira escolha no tratamento desta zoonose (BRASIL, 2006). Estes antimoniais existem no mercado sob duas formas: antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime® e o stibogluconato de sódio – Pentostan®. Estas drogas são tóxicas, nem sempre efetivas e na LV são usadas em esquemas prolongados (GONTIJO; MELO, 2004). A limitação de escolhas terapêuticas para as leishmanioses é o principal fator que a incluem no rol das chamadas doenças negligenciadas pela OMS.

No Brasil, a droga de eleição para o tratamento da LV é o Glucantime, permanecendo como tratamento inicial de escolha (BERMAN, 1997). Além dos antimoniais,

outras drogas estão sendo empregadas no tratamento das leishmanioses, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, miltefosine e a paromomicina (RATH et al., 2003).

A anfotericina B, no Brasil, vem sendo utilizada como tratamento alternativo da LV, sendo comercializada em frascos de 50mg. Em função de sua baixa solubilidade, a mesma deve ser reconstituída em 10mL de água destilada no momento do uso e na administração, a solução deverá ser diluída em soro glicosado a 5% na proporção de 1mg para 10mL. Devido ao risco de precipitação, a anfotericina B não deve ser misturada a outros medicamentos ou soluções que contenham eletrólitos. O efeito colateral deste medicamento é enorme, podendo-se destacar: cefaléia, febre, calafrios, astenia, vômitos, hipotensão, alterações pulmonares e complicações renais (BRASIL, 2006).

A pentamidina tem sido mais utilizada na Europa e África, como droga alternativa no tratamento da LV. Apesar de ser altamente tóxica, é bastante útil em casos de pacientes que não responderam aos antimoniais ou que sejam hipersensíveis ao antimônio (RATH et al., 2003). No Brasil, esta droga é comercializada em ampolas contendo 300mg/sal. Em pacientes com LV a dose administrada é de 4 mg/Kg/dia em dias alternados no total de 15 doses, não devendo ultrapassar a 2g como dose total (BRASIL, 2006).

O alto índice de resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão, principalmente pelo abandono do tratamento. Diante deste fato, a OMS direcionou esforços para pesquisa de novas drogas e novas formulações para as drogas que já vinham sendo utilizadas (GENARO, 2005). Como resultado deste estudo, foi disponibilizado uma nova droga de uso oral conhecida como miltefosine. Esta droga apresentou 95% de cura efetiva em estudo do calazar indiano (GONTIJO;MELO, 2004).

A paromomicina tem sido usada sozinha ou em combinação com antimônio pentavalente para o tratamento da LV. Sua superioridade em combinação com o Sb^{5+} comparado com Sb^{5+} sozinho foi claramente demonstrada em vários estudos na Índia (JHA et al., 1998). Em estudo realizado no Sudão (SEAMAN et al., 1993), também demonstrou que a combinação com o antimônio pentavalente foi possível para reduzir a duração do tratamento de 30 dias para 20 e 17 dias respectivamente, com superior eficácia e redução da mortalidade (SUNDAR;CHATTERJEE, 2006).

Os critérios de cura de pacientes com LV são essencialmente clínicos, podendo ser observado com o passar das semanas, o desaparecimento da febre, redução da hepatoesplenomegalia e melhora dos parâmetros hematológicos. O seguimento do paciente

tratado deve ser feito aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento e na última avaliação se permanecer estável, o paciente é considerado curado (BRASIL, 2006).

Em 2007, foi realizado o I Fórum de discussão sobre leishmaniose visceral canina (LVC) em Brasília, DF. Foram avaliados vários pontos relacionados à infecção com o objetivo de analisar as evidências sobre o tratamento da LVC e o risco que animais submetidos ao tratamento poderiam trazer à saúde humana. Como resultado foi elaborado a Portaria Interministerial nº1.426 de 11/07/2008, que proíbe o tratamento da LVC com medicamentos para humanos ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No entanto, esta proibição gerou algumas contestações, sendo então sugerido um novo fórum realizado também na cidade de Brasília/DF no mês de outubro de 2009. Neste encontro foram identificadas quatro consequências previstas para o tratamento canino: contribuição para disseminação da enfermidade que resulta na morte de 6,7% podendo chegar a 17% dos humanos acometidos no Brasil, índice que pode aumentar ainda mais em pacientes imunodeprimidos; manutenção de cães como reservatório do parasito, representando riscos para a população canina e humana; desenvolvimento da resistência de parasitos as poucas drogas disponíveis para o tratamento da LVH; e dificuldade de implantar medidas de saúde pública aumentando a resistência da população à eutanásia dos animais que continuarão como reservatórios para infecção do vetor. Por esta razão foi recomendada a manutenção da proibição do tratamento da LVC (BRASIL, 2009).

1.12 Medidas de Controle

Apesar do amplo conhecimento sobre os elementos da cadeia do ciclo de transmissão desta enfermidade, as estratégias de controle estão sendo pouco efetivas (COSTA; VIEIRA, 2001) e centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006).

Há poucos anos sugeriu-se que há uma necessidade de uma aproximação entre os investigadores e os trabalhadores de saúde pública, a fim de revisar as estratégias atuais de controle e definir os procedimentos capazes de avaliar seu impacto (COSTA; VIEIRA, 2001). Diversas iniciativas foram desenvolvidas, incluindo a implementação de laboratórios de

pesquisa que prestam serviços de referência ao Ministério da Saúde. Recentemente, a partir do final dos anos 90, as atividades do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) foram descentralizadas e agora estão sobre responsabilidade dos municípios, com supervisão dos estados. Entretanto, após esta descentralização, o desempenho das equipes locais deve ser monitorado de forma central, que necessita não somente avaliar, mas também suportar as atividades desenvolvidas. Isto é importante para melhoria do PCLV e desse modo seus impactos poderiam ser melhor avaliados (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a).

De acordo com Shaw (2007), o sucesso na eficácia das estratégias de controle será obtido quando se entender melhor a diversidade genética da *Leishmania* spp. e dos reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico de cada espécie.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma zoonose de grande impacto na saúde pública. Em Pernambuco, incide em praticamente todo o estado. Os municípios da região Agreste e Sertão são os que mais notificam casos de leishmaniose visceral. O município de Passira, localizado na região Agreste de Pernambuco, apresentou casos autóctones da doença, no período de 2000 a 2007, além de ter uma elevada abundância de flebotomíneos, especialmente de *Lutzomyia longipalpis*, e alta incidência de infecção canina, constituindo-se assim uma excelente área de estudo. Adicionalmente, em diversas localidades rurais do município a precariedade nas condições sanitárias, associadas às altas densidades de flebotomíneos e a presença de animais domésticos em ambientes peridomiciliares vem proporcionando ótimas condições para o estabelecimento e manutenção do ciclo de transmissão da doença.

Neste sentido, a determinação da sazonalidade e da taxa de infecção natural de flebotomíneos possibilitará uma importante contribuição para ampliar os conhecimentos sobre a epidemiologia desta zoonose na região e, assim, colaborar para a definição de melhores estratégias de controle, além de indicar o período em que poderá haver maior risco de transmissão, visto que a LV apresenta constante mudança no seu perfil epidemiológico. Concomitantemente, poderá contribuir para melhor compreensão sobre a manutenção desta endemia na região Nordeste, na qual a LV apresenta sua maior incidência no país e constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública.

3 PERGUNTA CONDUTORA

A determinação da distribuição sazonal e da infecção natural por *Leishmania* spp. da fauna de flebotomíneos poderão contribuir para o entendimento da manutenção do ciclo zoonótico da leishmaniose visceral no município de Passira, Agreste de Pernambuco?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Descrever o comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Passira, Agreste de Pernambuco.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar as espécies de flebotomíneos presentes nas áreas de ocorrência de casos de LV;
- b) Caracterizar a sazonalidade da fauna de flebotomíneos, especialmente de *Lutzomyia longipalpis*, considerando os fatores abióticos (temperatura, humidade e pluviosidade);
- c) Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos e em animais (*Galea spixii* e *Rattus rattus*) utilizados como isca animal.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

Estudo observacional do tipo descritivo como forma de avaliar a sazonalidade e a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. no município Passira, localizado na região agreste de Pernambuco.

5.2 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Passira, Agreste Sententrional do estado de Pernambuco (Figura 3). O município é formado pelos distritos sede e Bengalas e, pelos povoados de Pedra Tapada, Poço do Pau, Sítio Borba, Varjada, Varjada de Cima, Candiais, Vertente Seca, Cutias, Ribeiro do Mel, Apra, Vertente Seca II, Tamanduá e Avencas; possui 480 Km² e está localizado nas coordenadas geográficas 07°59'42''S; 35°34'50 W, a uma altitude de 176 m. Limita-se ao Norte com Salgadinho e Limoeiro, ao Sul com Gravatá, Pombos e Bezerros, ao Leste com Feira Nova e Glória de Goitá e a Oeste com Cumaru (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2009).

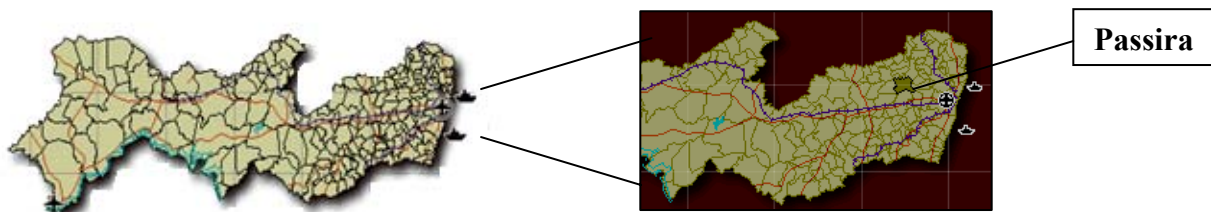


Figura 3 – Localização do município de Passira, Pernambuco.

Fonte: IBGE (2009)

O clima é tropical semi-árido com períodos de chuvas concentrados nos meses de abril a julho. A temperatura média anual é 24°C e o índice pluviométrico anual é de 720,7

mm. A vegetação nativa é formada pela caatinga hipoxerófila e por florestas subcaducifólia e caducifólia (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2009).

A taxa de urbanização é de 46,93% e a densidade demográfica é de 84,64 hab/Km². A população estimada é de 29.131 habitantes (IBGE, 2009). A agricultura é composta predominantemente por coco-da-baía, fava, feijão, milho e tomate (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2010).

5.3 Fluxograma de trabalho

Esquematização das capturas de flebotomíneos com armadilhas CDC, Shannon e Disney modificada e análise das amostras de flebotomíneos e roedores (Figura 4):

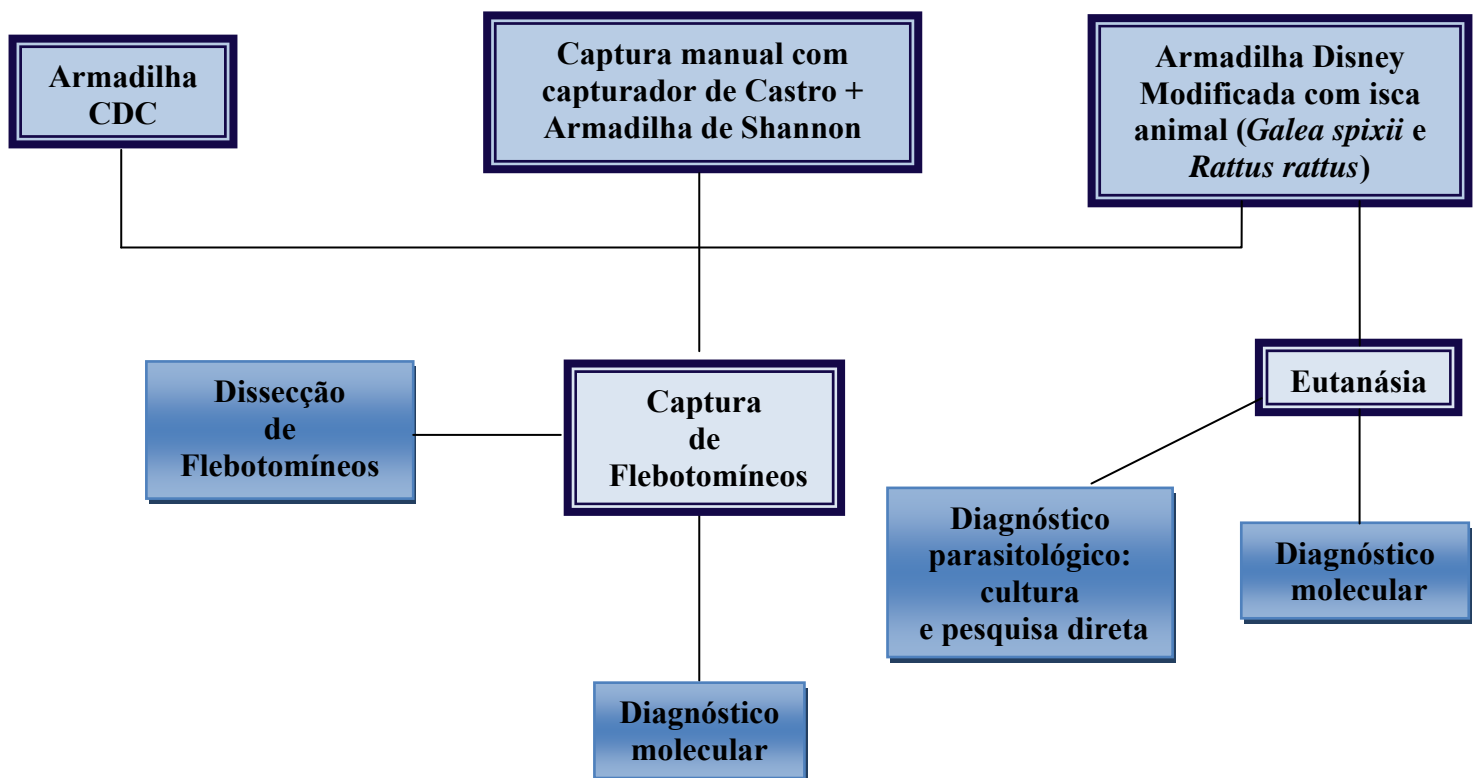


Figura 4- Esquematização das capturas de flebotomíneos e análise das amostras de flebotomíneos e roedores
Fonte: Costa (2011)

5.4 Flebotomíneos

5.4.1 Captura de flebotomíneos

Foram selecionadas 04 áreas para realização deste estudo: Apara, Poço do Pau, Sítio Borba e Varjada de Cima, a partir do seguinte critério: presença de cães e/ou animais de produção nos quintais e história de ocorrência de casos humano ou canino da doença (Figura 5).

As coletas de flebotomíneos foram realizadas no período de agosto/2009 a agosto/2010 com armadilhas luminosas do tipo CDC, semanalmente, quatro noites consecutivas ao mês, das 17:00 horas às 6:00 horas, totalizando 15 armadilhas CDC, com 624 horas de captura. Cada armadilha foi posicionada 1½ metro do nível do chão, sendo instaladas em diferentes ecótopos (Figura 5 e 6).

- Ecótopo 1 (E1): galinheiro, em todas as localidades
- Ecótopo 2 (E2): estábulo, em Varjada de Cima
- Ecótopo 3 (E3): curral, em Apara, Poço do Pau e Varjada de Cima
- Ecótopo 4 (E4): alpendre, em Poço do Pau
- Ecótopo 5 (E5): chiqueiro, em Apara, Sítio Borba e Varjada de Cima
- Ecótopo 6 (E6): plantação (cerca de aveloz), em Apara
- Ecótopo 7 (E7): intradomicílio, em Apara e Poço do Pau

Foram realizadas capturas manuais com auxílio de capturador de Castro, utilizando armadilha de Shannon (Figura 7), e, capturas com armadilha Disney modificada com isca animal (dois *Galea spixii* e um *Rattus rattus*) (Figura 8). Esta última foi posicionada próxima ao ecótopo E1.

Os flebótomos foram identificados de acordo com a classificação proposta por Young;Duncan (1994) em laboratório montado no ponto de apoio na área de estudo. Exemplares foram dissecados para a busca de infecção natural e tentativa de isolamento do parasito. Adicionalmente, foram formados pools com 5 ou 10 espécimes para extração e detecção de DNA do parasito através do teste de PCR. Os espécimes separados para PCR

foram acondicionados em tubos do tipo propileno com capacidade de 1,5ml e encaminhados ao Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/Fiocruz.

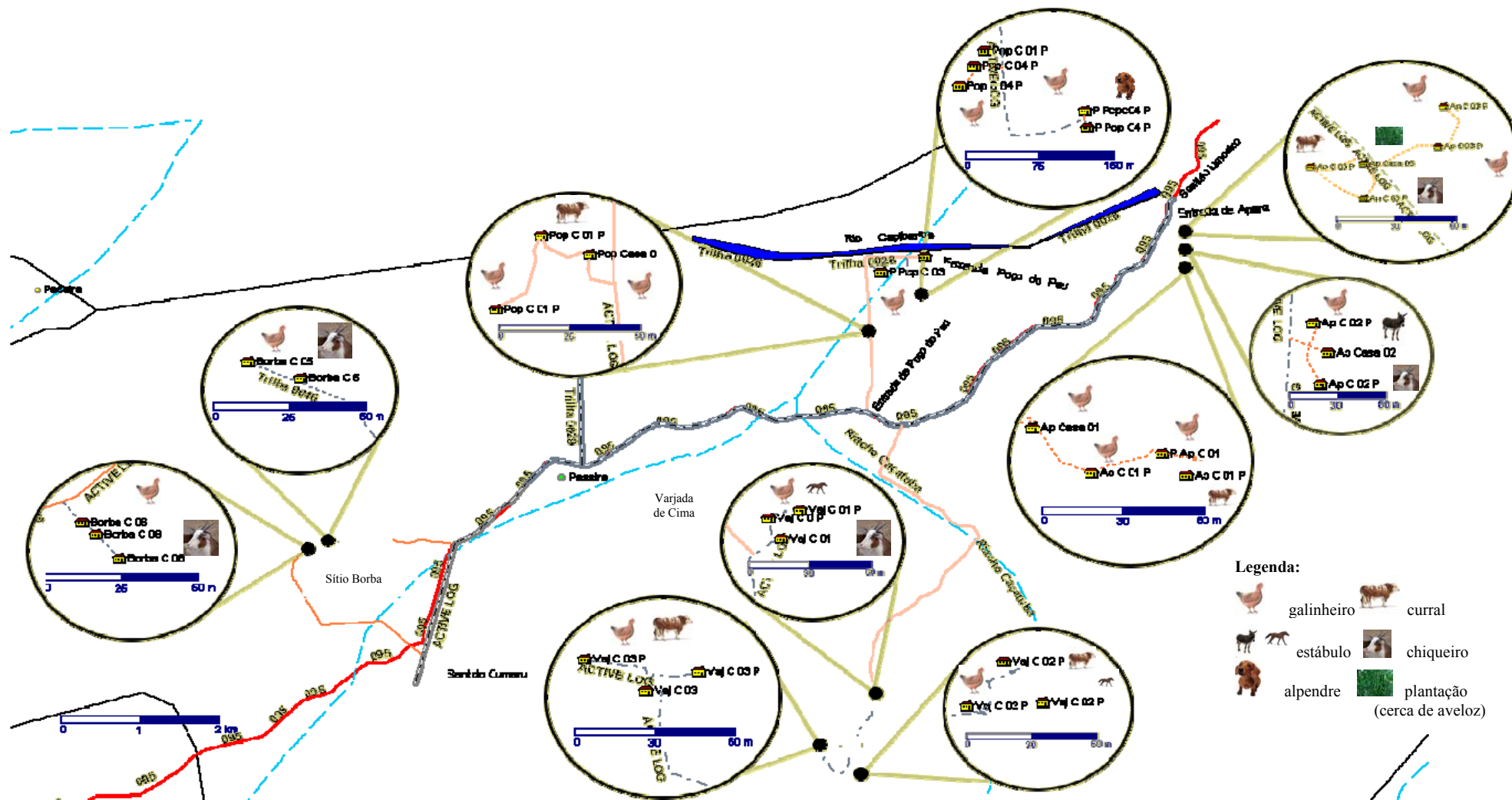


Figura 5 - Mapa dos pontos de coleta de flebotomíneos por localidade e ecótopo. Fonte: Silva e Matoso (2011).

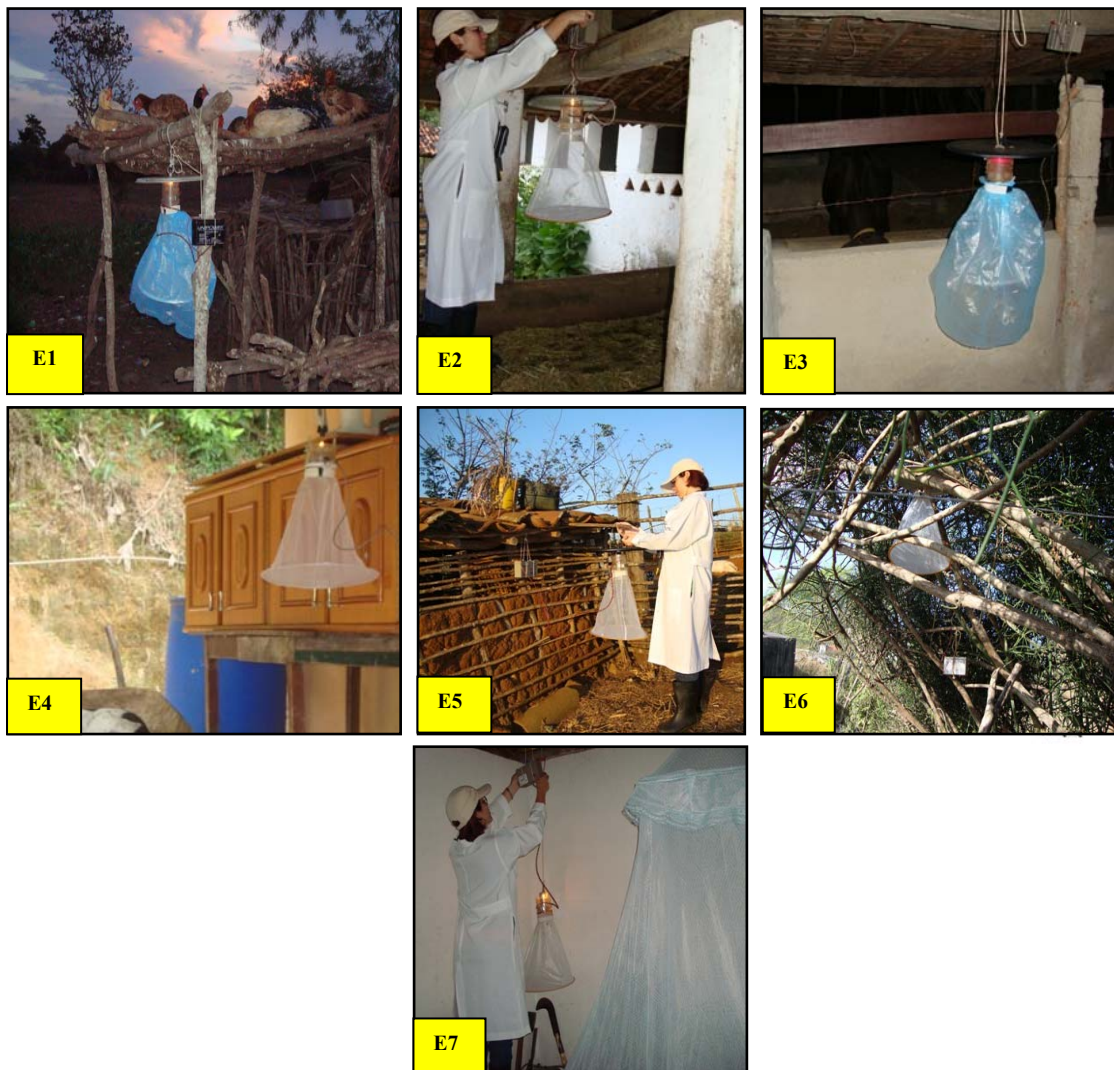


Figura 6- Distribuição dos ecótopos onde eram instaladas armadilhas tipo CDC, em Passira, PE.

Fonte: Costa (2010a)

Legenda: E1 – galinheiro; E2 – estábulo; E3 – curral; E4 – alpendre; E5 – chiqueiro; E6 – cerca de aveloz; E7 – intradomicílio



Figura 7 - 1. Armadilha de Shannon; 2. Captura manual com capturador de Castro
Fonte: Costa (2010b)



Figura 8 - Armadilha Disney modificada com isca animal (*Galea spixii* e *Rattus rattus*)
Fonte: Costa (2010c)

5.4.2 Dissecção de flebotomíneos

Fêmeas de flebotomíneos foram dissecadas de acordo com metodologia previamente descrita (LAINSON, 1997). De forma breve, cada fêmea foi dissecada numa pequena gota de solução salina estéril, tratada com antibiótico (200 UI de penicilina e 2,0 mg/ml de estreptomicina). Depois de separado, o tubo digestivo foi examinado entre lâmina e lamínula sob microscopia óptica, aumento de 400x, para verificar a presença de formas flageladas de *Leishmania* spp. A cabeça e os últimos três segmentos do abdômen das fêmeas dissecadas foram preservados para posterior identificação da espécie.

5.5 Dados meteorológicos

Os dados climáticos sobre temperatura, umidade relativa e índice pluviométrico, referentes ao período de estudo, foram obtidos junto ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

5.6 Abordagem molecular em flebotomíneos

5.6.1 Extração e purificação de DNA dos exemplares de flebotomíneos

Para extração do DNA de flebotomíneos utilizou-se o Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin kit (GE Healthcare)®, com algumas modificações. Inicialmente, foi realizada criteriosa maceração da amostra, com adição de 1 ml de PBS e centrifugação em 12.000xg durante 2 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado ao sedimento 100µl de Lysis solution 1 e ressuspenso através da homogeneização por vortex durante 15 segundos e adicionado 10µl de proteinase K e homogeneizado em vortex durante 15 segundos. O lisado foi incubado a 56°C durante 1 hora, seguida de outra incubação a 70°C

durante 10 minutos. Após centrifugação a 6.000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e adicionado 200µl etanol a 100% gelado. O sedimento foi mantido a -20°C por 18 horas, em seguida foi centrifugado a 6.500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, seco em temperatura ambiente. O pellet do DNA foi hidratado em 50µl de tampão TE (Tris-base 10mM, pH 8,0; Na₂EDTA-H₂O 1mM, pH 8), realizada a quantificação do DNA de todas as amostras e armazenado a -20°C até o uso. A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada através de espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec®), para avaliação do grau de pureza do DNA genômico.

5.6.2 Amplificação do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* por PCR

O DNA extraído foi amplificado para o complexo donovani (*Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania donovani*) utilizando-se os *primers* Linfl 23F 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' e Linfl 154R 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3' que amplificam um fragmento de 132 pares de base da região do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA). O volume total da reação foi de 25µl, sendo composto por Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, , pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 0,1mg/mL, 0.2 mM de cada dNTP, 05 pmoles de cada *primer* e 2.5 U de *Taq* DNA polimerase. A essa mistura são adicionados 2µL da amostra de DNA. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient®. A reação foi efetuada em 35 ciclos 94 °C (30s), 67 °C (1 min), 72 °C (30s) precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. O protocolo seguiu metodologia previamente descrita por Paiva-Cavalcanti et al. (2009) com modificações. Foram utilizados controles positivos de *Leishmania infantum* extraídos de cepa de referência (MHOM/BR/1974/PP75).

Foram utilizados dez microlitros dos produtos amplificados para análise através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% para o alvo de 132 pb corado com brometo de etídeo, marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Os produtos da amplificação foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação (Gel Logic 100 Imagem System Kodak®).

A taxa de infecção natural foi expressa como taxa mínima de infecção (TMI), calculada dividindo-se o número de grupos positivos pelo número total de espécimens

testados x 100 (PAIVA et al., 2006).

5.7 Isca animal

Três animais (dois *Galea spixii* e um *Rattus rattus*) provenientes da colônia de roedores do CPqAM/FIOCRUZ foram utilizados como isca animal em armadilha Disney modificada. Estas eram expostas próximas aos ecótopos por um período de quatro dias consecutivos. Vale salientar, que os animais além de estarem bem acondicionados, possuíam água e ração suficiente para todo o período. Todos os dias as armadilhas eram abertas para verificar a presença de flebotomíneos em seu interior e também para reposição de água e ração.

Após utilização na captura de flebotomíneos, os animais retirados das armadilhas foram colocados em caixa de plástico com tampa de metal (Figura 9), com dimensões 250 cm² de espaço para o animal e 18 cm de altura, e transportados para o Biotério NBA3 (Nível de Biossegurança Animal 3) do CPqAM e acondicionados em estante ventilada (Figura 10), sendo então observados por período de seis meses. Após este período esses animais foram eutanasiados.

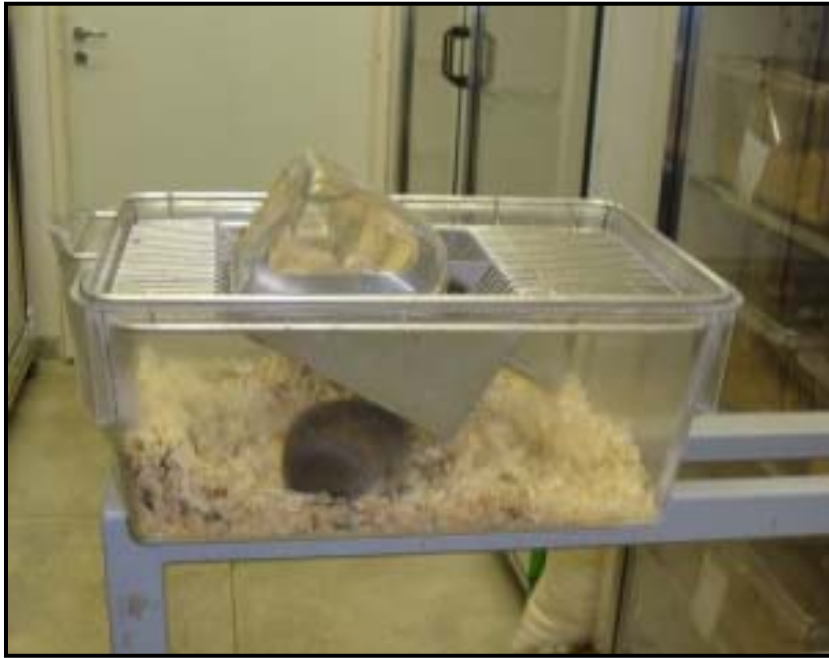


Figura 9 - Caixa de plástico com tampa de metal para acondicionamento de animais
Fonte: Costa (2011a)



Figura 10 - Estante ventilada para acondicionamento dos animais
Fonte: Costa (2011b)

5.8 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada utilizando-se câmara de CO₂ (Figura 11). De cada animal eutanasiado foi coletado fragmento de baço para inóculo em meio de cultivo NNN modificado (Difco 45) e preparo de lâminas de “imprint” de baço e pele e, esfregaço sanguíneo de fígado para pesquisa direta. As lâminas, após secagem, foram coradas com Giemsa 2% para posterior exame em microscópio óptico. Foram também coletados fragmentos de pele (orelha direita), baço e fígado. As biópsias foram armazenadas em nitrogênio líquido para análise molecular. Todo o procedimento de eutanásia foi realizado dentro das normas (International Organization for Standardization – ISO/15189) de segurança.



Figura 11 - Câmara de CO₂ para eutanásia de animais

Fonte: Costa (2011c)

5.9 Diagnóstico

5.9.1 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta

As lâminas de esfregaço de sangue de fígado, e, lâminas de imprint de pele e baço foram confeccionadas do material obtido durante a eutanásia dos roedores e examinadas em

microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2007). Na tentativa de isolamento *in vitro* de *Leishmania* spp. fragmento de baço dos animais foram imerso em solução salina e, em seguida, imerso em solução contendo antibióticos a 1% de penicilina e estreptomicina.

Posteriormente, o fragmento foi macerado em 1mL da mesma solução com antibióticos e inoculado em meio NNN modificado (WALTON; SHAW; LAINSON, 1977), para cultivo *in vitro*. As culturas foram observadas por 21 dias, em intervalos de 3 a 5 dias para pesquisa de promastigotas. Após esse período, as culturas com resultado negativo foram desprezadas.

5.9.2 Abordagem para o diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* spp. em roedores

5.9.2.1 *Extração e purificação de DNA de roedores*

A extração de DNA de fragmentos de pele (orelha direita, baço e fígado) dos roedores foi realizada com o Illustra GenomicPrep Cells™ and Tissue DNA Isolation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as instruções do fabricante. Para cada extração foi utilizado aproximadamente 20 mg.

Após precipitação do DNA genômico purificado, o “pellet” foi ressuspenso em 100 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a -20°C. Dois µL foram usados na PCR.

As amostras foram quantificadas utilizando o equipamento descrito no item 5.7.1.

5.9.2.2 *Amplificação do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* por PCR*

A detecção de DNA foi realizada através do método de PCR, utilizando-se como alvo a região do minicírculo do kDNA com *primers* específicos para o complexo donovani, de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2009), os quais amplificam um fragmento de 132 pb. Os

produtos amplificados foram estocados a 4°C até a sua análise, realizada em eletroforese em gel de agarose conforme descrito no subitem 5.7.2.

5.10 Análise estatística

A análise e o processamento estatístico dos dados foram realizados com o auxílio do programa Software R para o cálculo dos percentuais, Excel Microsoft® para a construção de gráficos e tabelas, os Testes de Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fisher para as análises estatísticas.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo possui licença da Comissão de Ética para uso de animais (CEUA) da FIOCRUZ, segundo protocolo intitulado: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão (Anexos A e B), e, autorização para atividades com finalidade científica (Anexo C) emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).

7 RESULTADOS

7.1 Captura de flebotomíneos

Durante o período de agosto de 2009 a agosto de 2010 foram capturados quatro espécies de flebotomíneos: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia lenti* e *Lutzomyia sallesi* (Tabela 1). As capturas ocorreram em ambientes de domicílio correspondente ao peridomicílio e intradomicílio. Foram identificados 24.226 exemplares, sendo a espécie *L. longipalpis*, vetora da leishmaniose visceral, a mais abundante, no ambiente peridomiciliar, apresetando significância quando comparada com as outras espécies ($p < 0,0001$). A porcentagem de machos capturados desta espécie 15.856 (98,30%) foi maior que a das fêmeas 7.860 (97,07%). A análise estatística comparando machos de fêmeas desta espécie apresentou significância ($p < 0,0001$). Foram dissecados um total de 181 exemplares, contudo não foi observado a presença de formas flageladas de *Leishmania* spp.

Tabela 1- Distribuição das espécies de flebotomíneos coletadas com armadilha CDC no município de Passira, entre agosto/2009 e agosto/2010.

Espécie	Total	Sexo				Localização				Dissecados		
		♂	%	♀	%	Intra	%	Peri	%	Pos	Neg	%
<i>L. longipalpis</i>	23.716	15.856	98	7.860	97	34	83	23.682	98	-	153	85
<i>L. evandroi</i>	392	219	1,4	173	2,13	6	14,63	386	1,6	-	20	11,04
<i>L. lenti</i>	95	48	0,3	47	0,6	1	2,43	94	0,4	-	8	4,41
<i>L. sallesi</i>	23	6	0,04	17	0,2	-	-	23	0,01	-	-	-
Total	24.226	16.129	100	8.097	100	41	100	24.185	100	-	181	100

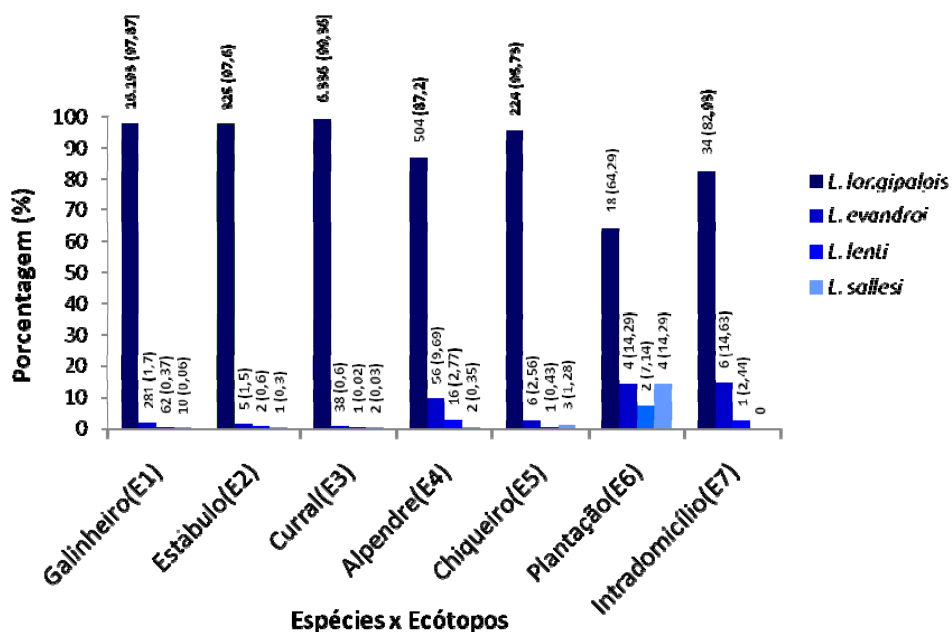
Sexo ($P < 0,0001$) pearson; Localização ($p < 0,0001$) fisher

Com relação aos flebotomíneos capturados em Armadilha de Shannon com auxílio de capturador de Castro, foram coletadas quatro espécies: *L. longipalpis*, *L. lenti* e *L. sallesi*, sendo a primeira em maior abundância. De todos os exemplares capturados, foram dissecados 30 espécimens, entretanto em nenhum foi observado formas flageladas de *Leishmania* spp (Tabela 2). Ademais, de todas as fêmeas coletadas, 10 estavam engurgitadas.

Tabela 2- Total das espécies capturadas em Armadilha de Shannon utilizando capturador de Castro, no período de estudo em Passira, Pernambuco.

Espécies	Armadilha Shannon			
	Macho	Fêmea	Dissecados	Total
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	258	85	30	373
<i>Lutzomyia evandroi</i>	-	-	-	-
<i>Lutzomyia lenti</i>	-	01	-	01
<i>Lutzomyia sallesi</i>	-	01	-	01
Total	258	87	30	375

A presença de animais de produção nos quintais foi frequente, sendo importante ressaltar que esses animais, principalmente galinhas, são abrigados em locais com precárias condições sanitárias. De acordo com o observado, entre os sete ecótopos trabalhados (E1-E7), o ecótopo E1 correspondente ao galinheiro foi o que mais atraiu os flebotomíneos, principalmente a espécie *L. longipalpis*, seguidos do curral - boi (E3) e alpendre - cão (E4) (Gráfico 1).

**Gráfico 1-** Percentual de flebotomíneos capturados em diferentes ecótopos com armadilha CDC, entre agosto de 2009 e agosto de 2010, no município de Passira, Pernambuco.

Fonte: Costa (2010)

No que diz respeito à captura de flebotomíneos com armadilha de Disney modificada, utilizando como isca animal os roedores *Galea spixxi* e *Rattus rattus*, foram

coletadas 228 exemplares de *L. longipalpis*, sendo 96 machos e 132 fêmeas. Destas, 23 encontravam-se engurgitadas. A outra espécie capturada foi *Lutzomyia sallesi*, totalizando 05 fêmeas, todas engurgitadas.

Das quatro localidades que foram instaladas armadilhas para coleta de flebotomíneos, Poço do Pau foi o local que obteve maior concentração da espécie *L. longipalpis* (Tabela 3). Pode-se observar diferenças estatísticas entre as regiões quanto a concentração desta espécie, sendo a região de Apra significativa quando comparada com todas as regiões ($p < 0,05$) e Poço do Pau com significância estatística quando comparado com Apra ($p < 0,05$) e Sítio Borba ($p = 0,0538$).

Tabela 3- Concentração de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados por localidade, em Passira, Pernambuco.

Espécies	Apra		Poço do Pau		Sítio Borba		Varjada de Cima	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<i>L. longipalpis</i>	6360	2111	9252	5630	4	3	251	112
<i>L. evandroi</i>	56	67	148	103	1	3	10	2
<i>L. lenti</i>	24	32	19	14	-	-	1	1
<i>L. sallesi</i>	1	7	4	10	-	-	-	-
Total	6441	2217	9423	5757	5	6	262	115

Geral $P < 0,0001$; 1 x 2 (Apra x Poço do Pau), 1 x 3 (Apra x Sítio Borba), 1 x 4 (Apra x Varjada de Cima) ($p < 0,05$); 2 x 3 (Poço do Pau x Sítio Borba) ($p = 0,0538$); 2 x 4 (Poço do Pau x Varjada de Cima) ($p = 0,0644$); 3 x 4 (Sítio Borba x Varjada de Cima) ($p = 0,7493$).

Para se verificar a flutuação populacional de flebotomíneos, foram utilizados os valores percentuais de temperatura ambiente, de umidade relativa do ar e de precipitação pluviométrica, os quais foram analisados com os dados de abundância mensal dos flebotomíneos. Observou-se no mês de fevereiro o maior índice de temperatura, enquanto que o mês de junho apresentou índices maiores de umidade e pluviosidade (Gráfico 2).

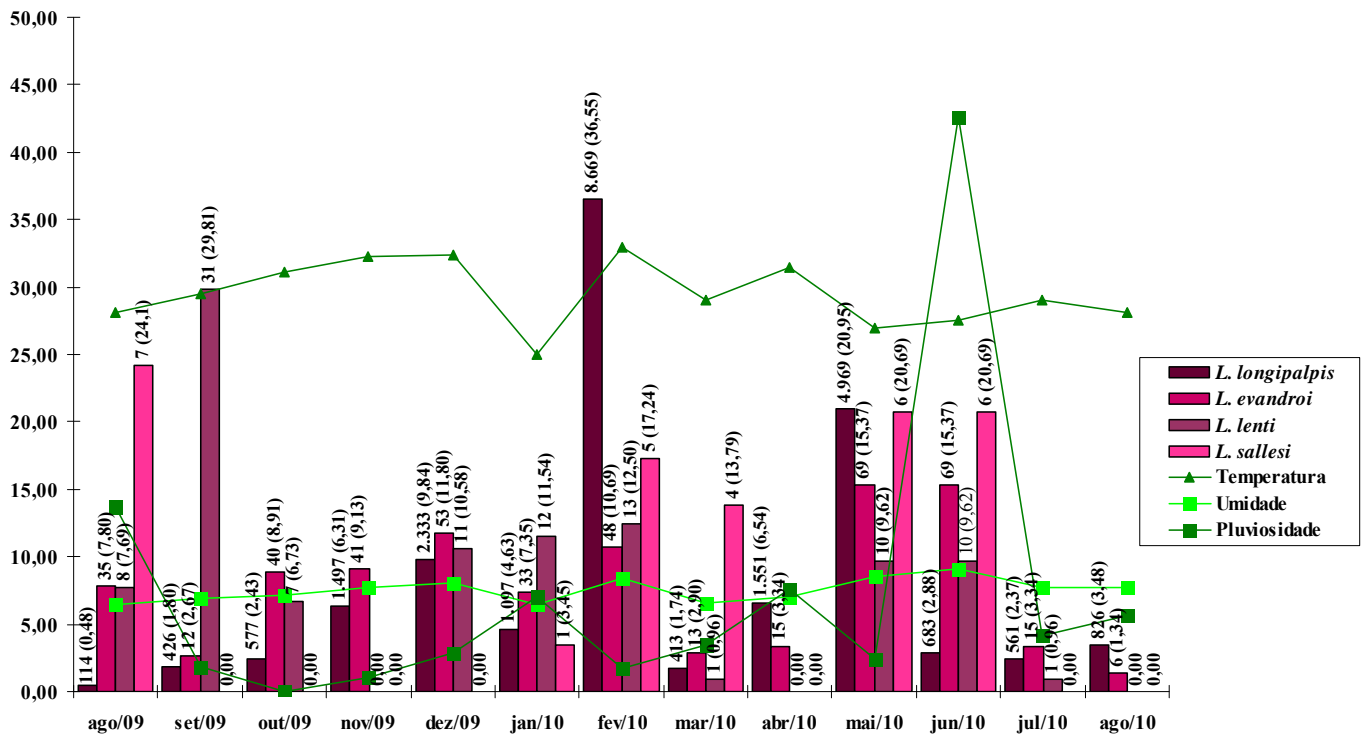


Gráfico 2- Percentual de flebotomíneos capturados em armadilha CDC entre Agosto/2009 e Agosto/2010, e variação da temperatura, umidade e pluviosidade em Passira, Pernambuco, Brasil.

Fonte: Costa (2010)

7.2 PCR específica para o complexo Donovanii (*Leishmania infantum chagasi*) de amostras de flebotomíneos

Foram analisadas por PCR para detecção de *L. infantum*, 628 amostras de flebotomíneos, sendo 79 pools de 05 exemplares e 549 pools de 10 exemplares. Das amostras das quatro espécies analisadas, somente 01 amostra apresentou resultado positivo ($p < 0,0001$), sendo este de *Lutzomyia longipalpis* (Figura 11).

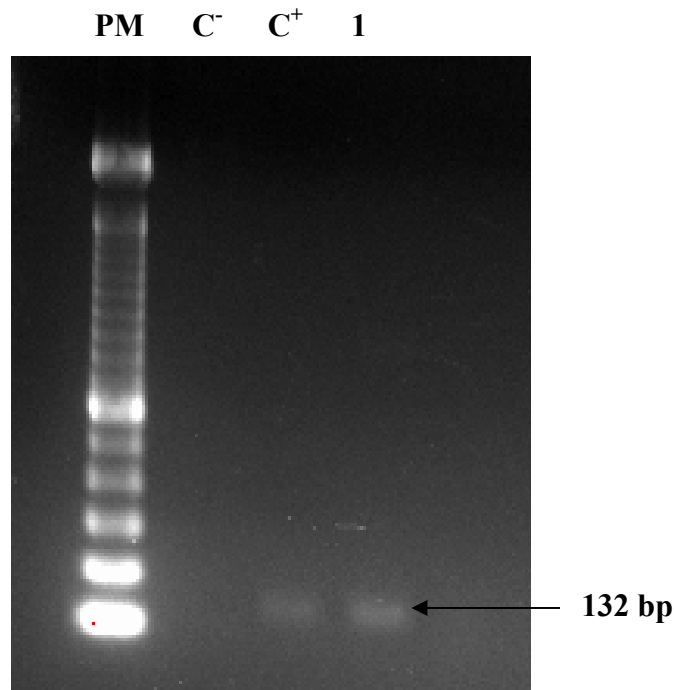


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produto de PCR de amostra de *Lutzomyia longipalpis* amplificado a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovaní (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostra de DNA de flebotomíneos (1). O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

7.3 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta

Foram realizados 08 inóculos em meio de cultivo NNN modificado de material de baço dos roedores, no entanto, nenhum isolamento foi obtido.

Utilizando o método de pesquisa direta, na busca de formas amastigotas de *Leishmania* spp., foi observada presença de amastigotas em 25% (2/8) das lâminas de esfregaço de fígado (*Galea spixii*). Em lâminas de imprint oriundas de baço (*Galea spixii*), foram visualizadas amastigotas em 25% (2/8). Todos os animais positivos na pesquisa direta de *Leishmania* spp. foram confirmados através da técnica de PCR, para detecção de *L. infantum*.

7.4 PCR específica para o complexo Donovanii (*Leishmania infantum chagasi*) em amostras de roedores

7.4.1 Amostras de baço, fígado, pele e lesão de *Galea spixii* e *Rattus rattus*

A PCR descrita por Paiva-Cavalcanti et al. (2009), capaz de identificar infecções causadas por parasitos do complexo Donovanii, foi positiva em 06/08 (75%) amostras de roedores, sendo 02 amostras de baço, 02 de fígado e 01 de pele de *Galea spixii* (Figura 12 e 13) e 01 amostra de baço, 01 de fígado e 01 de pele de *Rattus rattus* (Figura 13).

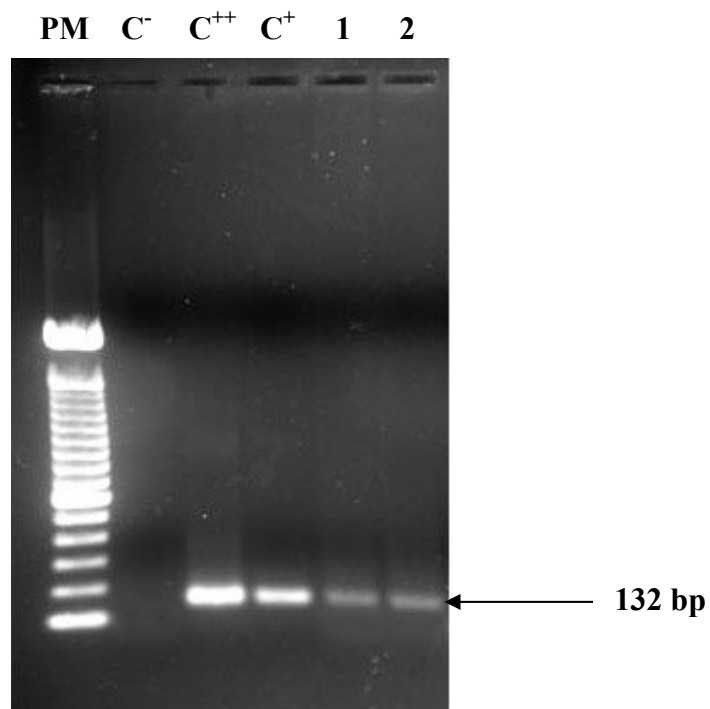


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de *Galea spixii* amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovanii (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺⁺ 10ng/μl), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostra de baço e fígado de *Galea spixii* (1 e 2), respectivamente. O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

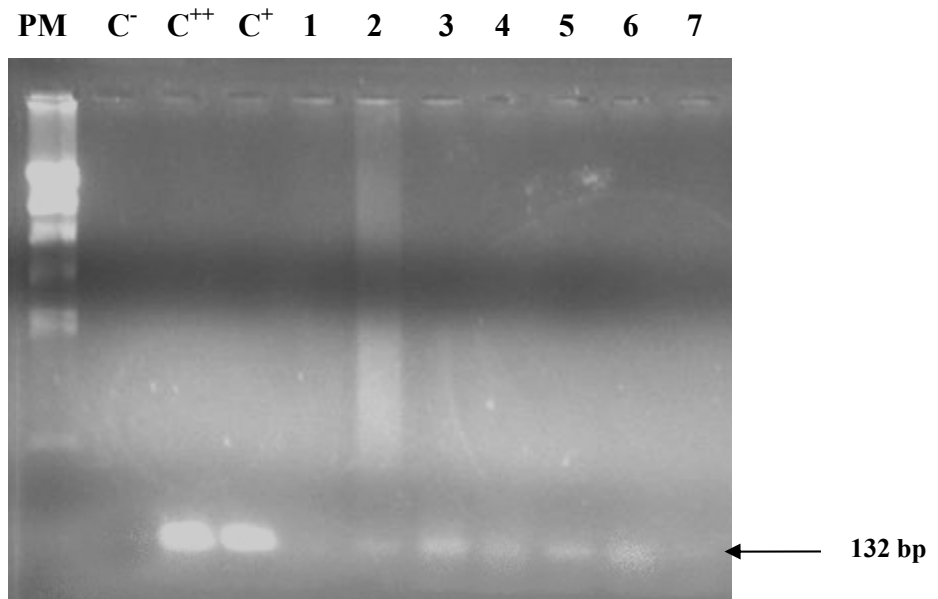


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de *Galea spixii* e *Rattus rattus* amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o complexo Donovaní (*Leishmania infantum chagasi*).

Nota: PM (λ + Hind III) (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺⁺ 10ng/ μ l), controle positivo (C⁺ 1ng/ μ l), amostra de pele (1 e 4), baço (3 e 5) e fígado (6) de *Galea spixii*, baço (2) e lesão (7) de *Rattus rattus*, respectivamente. O produto de amplificação de 132 bp encontra-se indicado por seta.

8 DISCUSSÃO

8.1 Captura de flebotomíneos

Nas Américas todas as formas de leishmaniose são zoonoses (LAINSON; SHAW, 2005). Diversos grupos de pesquisa têm contribuído com estudos sobre vetores e hospedeiros reservatórios envolvidos nos ciclos enzoótico e zoonótico, com hipóteses que investigam e comprovam o papel dos diferentes vetores como transmissores e de animais domésticos e silvestres como reservatórios de *Leishmania* que causam a forma visceral.

Nas últimas duas décadas a reemergência e urbanização da LV tem levado a doença a se tornar um grande problema de saúde pública no Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005). Diversos fatores podem ser citados como contribuintes para a expansão e aumento do número de casos da doença. Segundo Sherlock (1996), na Bahia como em outras regiões do país a pobreza, a desnutrição, o grande número de cães infectados, além da alta densidade de flebotomíneos tanto no intradomicílio como no peridomicílio, estão associados com o grande número de animais domésticos, péssimas condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico. Obrigatoriamente outros fatores devem estar envolvidos, em especial os fortes e decisivos componentes do potencial de transmissão advindos de fatores ligados ao vetor, tais como densidade vetorial e taxa de infecção parasitária, além da vulnerabilidade dos indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento da doença. No município de Passira, estas características estão bem evidenciadas, favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão da doença.

Rápidas mudanças nas condições ambientais em diversas regiões tropicais causadas pela destruição do habitat associadas aos processos de desmatamento e urbanização têm grande influência na população vetorial e, por conseguinte na transmissão da doença.

Os abrigos de animais domésticos construídos muito próximos das habitações humanas, a ausência de boas condições de higiene no peridomicílio e a localização deste ao lado de pequenos capões de mata são frequentemente observados nas áreas rurais em diversas regiões do Brasil (GOMES;NEVES, 1998; TEODORO, 1995). As localidades de Poço do Pau, Apará, Sítio Borba e Varjada de Cima, áreas de estudo deste trabalho, podem elucidar a existência destes fatores, que parecem favorecer a concentração de flebotomíneos. São fortes as evidências de que a presença de animais domésticos no peridomicílio atrai um grande

número de flebotomíneos, conseqüentemente, podem contribuir para o aumento do risco de transmissão de *Leishmania* spp. (BRAZIL, et al., 1991; FORATTINI, 1953; 1960; 1976).

No estado de Pernambuco, a maior concentração dos casos de LV encontra-se nas regiões Agreste e Sertão, em áreas onde grande parte da população reside em áreas rurais, com precariedade nas condições de infra-estrutura. No município de Passira onde predominam a cultura de milho e feijão, metade da população reside em área rural. Segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde (2010), foram registrados no período de 2002 a 2007, 06 casos de LV humana e, entre o período de 2005 e 2009, 35 cães apresentaram sorologia positiva.

Durante o século XX, foram registrados vários achados de *L. infantum* em flebotomíneos e animais silvestres, baseando-se em características morfológicas do parasito ao microscópio óptico ou através de técnicas moleculares (RODRIGUEZ et al., 1994; TESH; MODI, 1984).

Diversos estudos sobre o levantamento da fauna de flebotomíneos têm sido realizados por vários grupos de pesquisa, a fim de ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência desses insetos, além de ser um fator importante para implantação de políticas de controle epidemiológico. Neste estudo, os resultados obtidos demonstraram grande variação entre o número de flebotomíneos das quatro espécies coletadas, com destaque para *Lutzomyia longipalpis*. Foi verificada uma maior quantidade de exemplares machos capturados em relação às fêmeas, com significância estatística ($p < 0,0001$). Estes resultados podem ser corroborados com outros estudos (ALMEIDA et al., 2010; NUNES et al., 2008; RESENDE et al., 2006). Este fenômeno pode estar associado aos hábitos desses insetos, quando relacionado a presença de hospedeiros domésticos, visto que a maior atração do vetor foi observada em ambiente peridomiciliar.

A ampla predominância de *L. longipalpis* em relação às outras espécies de flebotomíneos também pode ser observada em trabalhos nos Estados de Mato Grosso do Sul (ALMEIDA et al., 2010; NUNES et al., 2008; SILVA; ANDREOTTI; HONER, 2007;) e em Minas Gerais (RESENDE et al., 2006).

Com relação à incidência de flebotomíneos no intra e peridomicílio, obteve-se maior número de exemplares capturados no peridomicílio, com significância estatística ($p < 0,0001$), o que pode ser observado em outros estudos (AZEVEDO et al., 1996; BARATA et al., 2005; BRANDÃO-FILHO et al., 1994; BRAZIL et al., 1991; DEANE; DEANE, 1962; FORATTINI, 1953, 1960, 1976; GOMES et al., 1983; SHERLOCK; GUITTON, 1969;

SHERLOCK, 1996;). Comportamentos como esse podem aumentar o risco da transmissão de LV nestes locais. A alta concentração de flebotomíneos no peridomicílio, especificamente de *L. longipalpis*, pode ser associada à presença de animais domésticos. A criação destes animais acompanhados de condições de higiene precárias cria um ambiente favorável à atração desses vetores (TEODORO et al., 1993; XIMENES; SOUZA; CASTELLÓN, 1999), o que também pode ser observado nas localidades estudadas em Passira. Em estudos realizados em Ponta Porã, Mato Grosso do Sul e em Belo Horizonte, Minas Gerais, respectivamente, não houve diferença significativa no que diz respeito à incidência de flebotomíneos capturados no intra e peridomicílio (ALEMIDA et al., 2010; RESENDE et al., 2006). Carvalho et al. (2007, 2010) demonstraram a presença de diversos flebotomíneos em ambiente peridomiciliar no município de São Vicente Ferrer, Pernambuco, sendo esta região endêmica para LV e LT. Apesar da ausência de *L. longipalpis* neste local e um predomínio de *L. migonei* no peridomicílio com achados de infecção natural por *L. infantum*, sugere-se fortemente que esta espécie esteja atuando no ciclo zoonótico da LV na região.

Toda esta característica comportamental, principalmente de *L. longipalpis*, foi evidenciada em nosso estudo, já que nas habitações que não possuíam animais domésticos as capturas foram escassas ou mal sucedidas, sendo que em alguns pontos de Apara, Poço do Pau e Sítio Borba não foi capturado sequer um exemplar durante o período de estudo.

Em relação aos achados encontrados quanto ao ecletismo de *L. longipalpis*, observa-se que o écotopo E1, referente ao galinheiro, é o mais atrativo. Estes resultados corroboram com outros estudos similares, no qual foi demonstrada a preferência deste vetor pelas galinhas (AGUIAR; VILELA; LIMA, 1987; ALEXANDER et al., 2002). Nossos resultados demonstram que, além do galinheiro, esta espécie também possui preferência por outros animais como, bovinos (bois), equinos (cavalos) e caprinos (bodes e cabras), o que comprova o seu caráter oportunista (MORRISON; FERRO; TESH, 1993; QUINNELL; DYE, 1992) e constitui um aspecto ecológico de grande relevância na epidemiologia da LV.

No Rio Grande do Norte, Ximenes; Souza; Castellón (1999), também demonstraram a atratividade de flebotomíneos aos abrigos de animais domésticos e silvestres, onde *L. longipalpis* foi observado com predominância nos abrigos de equinos e aves. Reinhold-Castro et al. (2008), também verificaram um número expressivo de flebotomíneos coletados nos ecótopos representados pelos galinheiros (88,7%), do que os coletados nos demais ecótopos.

A atratividade de flebotomíneos as galinhas está bem estabelecida na literatura. Fêmeas de *L. longipalpis* alimentam-se de sangue de galinha e, sua presença maciça em

galinheiros é considerada uma evidência epidemiológica importantíssima para a incidência de LV (ALEXANDER et al., 2002; SARAIVA et al. 2011). Sugere-se que os galinheiros podem estar atuando como barreiras zooprofiláticas, diminuindo a população de flebotomíneos no domicílio. Esse tipo de comportamento está bem estabelecido nas áreas trabalhadas em Passira, no qual se pode observar uma quantidade significativa destes vetores nos galinheiros, enquanto no interior das casas foram verificados números insignificantes, refletindo-se então na hipótese de que as galinhas participam da manutenção do ciclo zoonótico da LV na região. Como observado nos estudos supracitados, pode-se sugerir a existência de uma barreira zooprofilática em Passira diante dos resultados observados, entretanto são necessários mais estudos para melhor compreensão do papel deste hospedeiro no município.

Os resultados obtidos com Armadilha de Shannon e Armadilha Disney modificada complementam informações relativas da fauna de flebotomíneos na área de estudo, apesar da baixa densidade de vetores capturados com estas armadilhas quando comparados com a armadilha CDC. No entanto, apesar desta baixa densidade de flebotomíneos coletados, o resultado parece ter sido mais eficiente, visto a positividade dos animais utilizados como isca animal, tanto no diagnóstico parasitológico quanto no molecular. Já em estudo realizado por Dorval et al. (2010), a eficiência na captura de flebotomíneos foi melhor observada quando era utilizada armadilha de Disney em comparação as outras armadilhas supracitadas.

Nossos achados com relação à concentração de *L. longipalpis* por localidade, demonstraram que a localidade de Apara apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a Poço do Pau, Sítio Borba e Varjada de Cima, já Poço do Pau foi significativo ($p < 0,05$) com Apara e Sítio Borba ($p = 0,0538$). Estes resultados nos deixam atentos quanto à participação desta espécie na transmissão da LV nestas regiões.

Analisando-se a curva sazonal de flebotomíneos, especificamente de *L. longipalpis*, com as variações climáticas (temperatura, pluviosidade e umidade), verificou-se neste estudo uma maior abundância desta espécie após períodos chuvosos. Observando-se a curva da sazonalidade, o mês de fevereiro apresentou um maior número de flebotomíneos, sendo explicada pela combinação da elevada temperatura, umidade, além de alta precipitação pluviométrica do mês anterior. Estes dados também foram verificados em diversas regiões do Brasil como, Minas Gerais, Maranhão e Mato Grosso do Sul (ALEMEIDA et al., 2010; REBÊLO et al. 2001; RESENDE et al., 2006), além destes outros grupos de pesquisa também avaliaram o aumento da densidade populacional deste vetor durante ou após os períodos de chuva (MICHALSKY et al., 2009; SOUZA et al., 2004). Deve-se levar em consideração a

necessidade de um amplo período e maior quantidade de capturas, para verificar a real associação entre as variáveis climáticas e a densidade total de flebotomíneos na área de estudo.

A presença constante e a abundância elevada de *L. longipalpis* é motivo de alerta para a possibilidade de surtos de leishmaniose visceral no município de Passira, conferindo-lhe papel importante na epidemiologia da LV na região, já que no passado, casos de LV canina e humana foram notificados.

8.2 Abordagem molecular em flebotomíneos

Nos últimos anos, observou-se um progresso significativo no desenvolvimento de técnicas úteis nos estudos epidemiológicos. Com o advento da biologia molecular, pode-se verificar através da PCR a amplificação de DNA que se constitui numa alternativa prática e vantajosa, por ser um método altamente sensível e específico na detecção de *Leishmania* spp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (MICHALSKY et al., 2002; MINODIER et al., 1997; MULLER et al., 2003; PITA-PEREIRA et al., 2005; WEIGLE et al., 2002). As principais vantagens deste método molecular são sua sensibilidade e especificidade, que são pouco dependentes do número, estágio e localização dos parasitos no trato digestivo do inseto (PEREZ et al., 1994).

O método clássico mais utilizado é laborioso e consome muito tempo na pesquisa pelo parasito *in loco*, requerendo muita experiência na detecção em microscopia ótica (RODRIGUEZ et al., 1994; TESH;MODI 1984;). Além disto, a confirmação dos casos positivos precisa ser feita através do isolamento do parasito em cultura, frequentemente suscetível à contaminação, ou ainda através da inoculação em animais de laboratório, pois outros flagelados também são encontrados no trato digestivo destes insetos (RODRIGUEZ et al., 1994; TESH;MODI 1984).

No presente estudo não foi encontrada nenhuma forma flagelada de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos dissecadas. É evidente a maior sensibilidade na detecção da infecção utilizando a PCR, o que vem sendo descrito em várias regiões com casos recentes de leishmanioses: 1,3% no Sucre, Venezuela (JORQUERA et al., 2005); 1,1% na Urana e Puerto Cabello, Venezuela (FELICIANGELI et al., 1994); 1,1% em Chaute, Peru (PEREZ et al.,

1994); 0,4% no estado da Bahia, Brasil (MIRANDA et al., 2002); 2% na cidade do Rio de Janeiro (PITA-PEREIRA et al., 2005); 9,1% em Tucumán e Salta, Argentina (CÓRDOBA-LANÚS et al., 2006); 3,9% em Janaúba, Minas Gerais (MICHALSKY et al., 2011). Em Passira (Poço do Pau), verificou-se que a taxa de infecção de 0,15%, correspondia a um pool de 10 exemplares de fêmeas de *L. longipalpis*, apresentando significância estatística ($p < 0,0001$).

Nas coletas realizadas na área em estudo onde a prevalência de leishmaniose canina é significativa, houve o predomínio de *L. longipalpis*. Sabe-se que a taxa de *Leishmania* no vetor é considerada baixa na natureza, mesmo em áreas endêmicas para LV, mas baseado na capacidade vetorial deste vetor, no registro de casos autóctones da doença e na abundância e distribuição espacial de *L. longipalpis* com a área de ocorrência de casos da doença, pode-se sugerir sua participação no ciclo de transmissão da LV no município.

8.3 Diagnóstico parasitológico e molecular em roedores

Apesar de ser conhecida a dificuldade de crescimento do parasito em meio de cultura devido às contaminações, o cultivo *in vitro* é fundamental, pois permite o isolamento de *Leishmania* para posterior identificação e caracterização da espécie. (RODRIGUEZ et al., 1994; TESH;MODI 1984). Embora tenhamos obtido positividade em PCR (75%) e encontrado amastigotas na pesquisa direta de imprint de baço (25%) e esfregaço (25%) dos roedores eutanasiados, infelizmente não foi possível o isolamento do parasito. Brandão-Filho e Shaw (2006) também demonstraram dificuldade de isolamento de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Os autores atribuem o sucesso no isolamento de *Leishmania* spp. ao período em que os animais apresentam parasitemia elevada. Entretanto, os fatores que controlam os níveis do parasito em reservatórios silvestres ainda são desconhecidos.

Através da abordagem da PCR para detecção de *Leishmania* do complexo Donovanii (*L. infantum*), foi obtida no presente estudo uma positividade de 75% (06/08) das amostras dos animais examinados, sendo positivas amostras de baço, fígado e pele provenientes de dois espécimes de *Galea spixii* e amostra de baço proveniente de um *Rattus rattus*. Embora não tenhamos obtido significância estatística ($p = 0,1336$) entre as amostras, por conta de seu número reduzido, não se pode descartar a importância deste achado, sendo verificado também em outros estudos. Casos de infecção natural por *L. infantum* registrados em *Rattus rattus*

também foram observadas por outros autores (OLIVEIRA et al., 2005; ZULETA et al., 1999). Em áreas da Itália e Arábia Saudita, áreas com focos ativos de LV humana, *Rattus rattus* tem sido encontrado naturalmente infectado com *L. donovani* e *L. infantum*, sendo importante na manutenção da doença (GRANDONI et al., 1983; IBRAHIM et al., 1992). Ademais, o *Rattus norvegicus* também foi encontrado infectado com *L. infantum* na Itália (DI BELLA et al., 2003). Em estudos com infecção experimental em *Galea spixii*, Barbosa et al. (2008) encontraram infecção em duas amostras de baço. Desta forma, para esclarecer o papel desses roedores como hospedeiros de *Leishmania*, são necessários mais estudos sobre a participação desta espécie nos ciclos de transmissão da LV.

Em Pernambuco, a LV está bem distribuída em todas as regiões do estado e a ampliação no conhecimento de sua epidemiologia é a ferramenta chave para o controle. De fato, mais pesquisas referentes à ecologia de flebotomíneos e a epidemiologia da LV são necessárias. É de fundamental importância conhecer a sazonalidade das espécies vetoras, se existe expansão desses vetores e o impacto na epidemiologia da doença, para propor as autoridades específicas um estreitamento no programa de controle do estado.

Neste sentido, este estudo contribui para a identificação das espécies de flebotomíneos vetores e caracterização da sazonalidade, contribuindo diretamente com a identificação do período em que poderá haver maior risco de transmissão e corroborando os conhecimentos atuais sobre a ecoepidemiologia da LV. Por outro lado, os resultados obtidos podem auxiliar os serviços de vigilância epidemiológica desta endemia na definição de estratégias de controle mais eficazes na região.

9 CONCLUSÕES

- a) A fauna de flebotomíneos é composta por quatro espécies: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia lenti* e *Lutzomyia sallesi*;
- b) *Lutzomyia longipalpis* é a espécie com maior abundância nas quatro áreas trabalhadas neste estudo;
- c) O achado de infecção natural de *L. longipalpis* por *L. infantum*, somado à abundância de exemplares capturados, sugere a possível participação desta espécie no ciclo de transmissão da LV na área de estudo;
- d) A verificação de infecção natural em “pools” específicos de flebotomíneos, utilizando a técnica da PCR, mostrou-se eficaz, com a possibilidade de processar e identificar a presença específica de *Leishmania*, de forma mais rápida que a técnica de dissecação;
- e) Foi possível observar picos de densidade de flebotomíneos após os períodos chuvosos;
- f) A infecção natural em *Galea spixii* e *Rattus rattus* sugere a existência do ciclo enzoótico na região, indicando que mais estudos são necessários para elucidar o papel destes animais na manutenção do ciclo enzoótico;

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO. Perfil do município de Passira. Disponível em: <http://www.atendimentoagcondepe_fidem@fisepe.pe.gov.br> Acesso em: 25 jul. 2009.

AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.82, n. 4, p. 583-584, out./dez, 1987.

ALBUQUERQUE, A. F. R.; BRITO, R. S.; MORAIS, N. O. Importante foco de mal de Chagas e leishmaniose visceral americana no Vale do Cariri (Estados de Ceará e Pernambuco). O Hospital, Rio de Janeiro, v. 2, p.61-69, 1942.

ALEXANDER, B. et al. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.

ALMEIDA, P. S. et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.43, n.6, p.723-727, nov./dez, 2010.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 12, p.552-557, 2006.

ARTAN, R. et al. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Journal of Gastroenterology and Hepatology, Melbourne, v. 21, n. 1, p. 299-302, 2006.

AZEVEDO, A. C. R. et al. The sand fly fauna (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 91, n.1, p.75-79, jan./fev,1996.

BADARÓ, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Disease, Oxford, v. 154, p.1003-1011, 1986.

BARBOSA, P. B. B. M. et al. Experimental infection parameters in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae) with *Leishmania infantum chagasi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 545-548, set. 2008.

BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, n.5, p.421-425, set./out, 2005.

BASSET, D. et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. Microbes and Infection, Paris, v. 7, n. 13, p. 1370-1375, 2005.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERN, C. et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladesh village. American Journal Tropical of Medicine and Hygiene, Baltimore, v.76, p.909-914, 2007.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. Of Cattle, Sand Flies and Men: A Systematic Review of Risk Factor Analyses for South Asian Visceral Leishmaniasis and Implications for Elimination. Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v.4. n.2. p. 1-9, 2010.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. Veterinary Journal, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BOEHME, C. C. *et al.* Congenital visceral leishmaniasis. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 359-360, 2006.

BRANDÃO FILHO, S.P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco Brazil: Eco-epidemiological aspects in Zona da Mata region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.89, n.3, p.445-449, jul./set, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; SHAW, J.J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. Trends in Parasitology, London, v. 22, n. 11, p. 500-501, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 24 mar. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009; Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf>. Acesso em: 13 out. 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 13 abr. 2011.

BRAZIL, R. P. et al. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parassitologia, Roma, v. 33, p. 113-117, 1991.

CABRERA, M. A. A. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 45, p. 79-83, 2003.

CARVALHO, M. R. et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n.5, p. 1227-1232, 2007.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica, Basel, v.116, n.1, p. 108-110, maio. 2010.

CESSE, E. A. P. et al. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife, v. 1, n. 2, p. 167-166, 2001.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, p. 873-882, nov. 2007.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Warrenton, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CÓRDOBA-LANÚS, E. et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern argentina. Acta Tropica, Basel, v. 98, p. 1-5, 2006.

CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr, 2001.

COSTA, P. L. Distribuição dos ecótopos onde eram instaladas armadilhas tipo CDC, em Passira, PE. 18 mar. 2010a. 7 fotografias.

COSTA, P. L. 1. Armadilha de Shannon; 2. Captura manual com capturador de Castro. 20 mar. 2010b. 2 fotografias.

COSTA, P. L. Armadilha Disney modificada com isca animal (*Galea spixii* e *Rattus rattus*). 15 abr. 2010c. 3 fotografias.

COSTA, P. L. Caixa de plástico com tampa de metal para acondicionamento de animais. 03 abr. 2011a. 1 fotografia.

COSTA, P. L. Estante ventilada para acondicionamento dos animais. 03 abr. 2011b. 1 fotografia.

COSTA, P. L. Câmara de CO₂ para eutanásia de animais. 03 abr. 2011c. 1 fotografia.

CUNHA, S. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 89, n. 2, p. 155-158, 1995.

DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, F. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandflies of an urban focus of visceral leishmaniasis, Pernambuco State. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v. 34, n. 2, p. 157-160, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 48, n.3, p. 151-156, mai./jun, 2006a.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania chagasi*: participação do *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006b, p. 116-117.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64-67, jan./feb, 2006c.

DANTAS-TORRES F; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n.4, p.352-356, jul./agst, 2006d.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da leishmaniose visceral em Pernambuco. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.40, n.3, p.537-541, 2006e.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.43, n.6, p. 733-736, nov./dez, 2010.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania*

donovani, em área endêmica de calazar, no Ceará. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 61- 76, 1955a.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955b.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 162p. 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 4, p.108-212, 1962.

DI BELLA, C. et al. Are rodents a potencial reservoir for leishmania infantum in Italy? Journal Mountain Ecology, Itália, v.7 (supl), p. 125-129, 2003.

DORVAL, M. E. C. et al. Sandy fly with Disney traps in area of occurrence of Leishmania (Leishmania) amazonensis in the State of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.43, n.5, p.491-495, set./out, 2010.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 1, p. 4-6, 2006.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). Revista Clínica Veterinária, São Paulo, n. 28, p. 36-44, 2000.

FAUST, E.C.; RUSSEL, P.F.; JUNG, R.C. Leishmanioses. In: BEAVER, C. H.; CUPP, E.W.; JUNG, R. C. Parasitologia Clínica de Craig & Faust. 3 ed. México, Salvat, 1974. 888 p.

FELICIANGELI, M. D. et al. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-Central Venezuela. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 8, p. 317-324, 1994.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology, Oxford. v.18, p. 7061-1067, 2004.

FISSORE, C. et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington DC, v. 42, n. 11, p. 5332-5333, 2004.

FORATTINI, O. P. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, v. 7, p. 158-167, 1953.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae – Leishmanioses – Bartonelose. In: Entomologia Médica, São Paulo: Edgard Blucher, 1973. vol. 4.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 2, p. 195-200, 1960.

FORATTINI, O. P. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 10, p. 31-43, 1976.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 111, p.161 – 173, 2003.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 159-167, 2006.

GALLATI, E. A .B. et al. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.31, p. 378-390,1997.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E. F., Lainson, R., editors. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003. p. 23-51.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. Fonte In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 10, p. 67-83.

GOMES, A. C. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extra-florestal. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 17, p. 23-30, 1983.

- GOMES, A. C. et al. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. Anthropophilic Phlebotomus fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 31, p.32-39, 1989.
- GOMES, A. C.;NEVES, V. L. F. C. Estratégia e perspectiva de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 6, p. 553-558, 1998.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, N. M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.7, p.338-349, 2004.
- GRADONI, L. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v.77, p. 427- 31, 1983.
- HANDMAN, E. Cell Biology of Leishmania. Advances in Parasitology, London, v. 44, p. 1-39, 2000.
- HUGGINS, D. Calazar em Pernambuco: Relato de dois casos. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, v.1, n.1/4, p.17-23, 1973.
- IBRAHIM, E. A. et al. Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 9. The black rat (*Rattus rattus*) a probable reservoir of visceral leishmaniasis in Gizan province, south –west Saudi Arabia. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 86, p. 513-514, 1992.
- IBGE. @cidades.Pernambuco.Recife. Disponível em:
< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> > Acesso em: 25 jul 2009.
- IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. Veterinary Parasitology, New York, v. 113, p. 99-113, 2003.
- JHA,T. K. et al. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. BMJ, London, v.316, p. 1200-5, 1998.

JORQUERA, A. et al. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre, Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n.1, p. 45-48, fev. 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) The leishmaniasis in Biology and Medicine, London: Academic Press, vol. 1, p. 1-120, 1987

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revista Pan-Amazônica de Saúde, Pará, v.1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, London, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L., BALOWS, A., SUSSMAN, M. (Eds.), Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections. 10 ed., v. 5, London. Hodder Arnold. 2005. cap 17, p. 313-349.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis - Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135-137, jan./mar, 1990.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 377-387, mai./jun, 1997.

LAINSON, R., SHAW, J.J.. New World Leishmaniasis: The neotropical leishmania species. In: Cox Feg, Kreier JP, Wakelin D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, dec. 2005.

LOPEZ, M. et al. The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 308-314, 1988.

LUZ, Z. M. P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília. v. 34, n. 3, p. 249-254, 2001.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. Veterinary Parasitology, New York, v. 142, p. 271-280, 2006.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose Visceral (Calazar). Jornal Brasileiro de Medicina, Rio de Janeiro, v.41, p. 61-84, 1981.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitology Today, Cambridge, v. 10, n.1, p. 34-37. 1994.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion transmitted visceral leishmaniasis. Transfusion Medicine, Oxford, v. 14, n. 4, p.319-321, 2004.

MELLO, D.A. et al. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumba (Mato Grosso do Sul State, Brazil). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 259, abr./jun, 1988.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 44, p. 255- 259, 2002.

MICHALSKY, E. M. et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.104, n.1, p. 56-61, fev. 2009.

MICHALSKY, E. M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.44, n.1, p. 58-62, jan./fev, 2011.

MINODIER, P. et al. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.35, p. 2551-2555, 1997.

MIRANDA, J. C. 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n.2, p. 185-188, mar. 2002.

MIRANDA, G. M. D. Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

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

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 44, n.1, p. 76-78, jan./fev, 2011.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 97, s. 1, p. 29-45, 2003.

MORENO, E. C. et al. Risk factors for leishmania chagasi infection in na urban area of Minas Gerais State. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.38, n.6. p.456-463, nov./dez, 2005.

MORRINSON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. American of Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.49, p.68-75, 1993.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. Parassitologia, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

MULLER, N. et al. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assesment of the diagnostic amplification reaction. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 114, p. 223-229, 2003.

NASCIMENTO, M. D. S. B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e Intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n.6, p. 1801-1807, 2005.

NUNES, V. L. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 52, p. 446-451, 2008.

OLIVEIRA, H. Epidemiologia do Calazar. Revista Brasileira de Medicina, v. 17, n. 1, p. 56-58, 1960.

OLIVEIRA, F. S. et al. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 129, p.219-227, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 10 abril. 2011

PAGLIANO, P. et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London, v. 55, n. 2, p. 229-233, 2005.

PAIVA, B. R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Tropica, Basel, v.99, p.252-259, 2006.

PAIVA-CAVALCANTI, M. Desenvolvimento e Avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. The Veterinary Journal, v. 189, p. 356-358, 2009.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clinical infectious diseases, Chicago, v. 22, p.1-11, 1996.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. Bras Med. v.48, p. 949-50, 1934.

PEREZ, J. E. et al. Natural Leishmania infection of Lutzomyia spp. in Peru. Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene, London, v. 88, p. 1614, 1994.

PEREIRA, G. et al. Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. Boletim Trimestral Clínico de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Recife, v.5, n.1, p.53-70, 1985.

PIMENTA, P.; SECUNDINO, N.F.C.; BLANCO, E.E.N. Interação vetor-hospedeiro. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. (eds). Flebotomíneos do Brasil. 1º ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 275-279.

PITA-PEREIRA, D. et al. Identification of naturally infected Lutzomyia intermedia and Lutzomyia migonei with Leishmania (Viannia) braziliensis in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 99, n.12, p. 905-913, 2005.

PRASAD, L. S. N.; SEN, S.; GANGULY, S. K. Renal involvement in Kalaazar. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 95, p. 43-46, 1991.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. Jornal de. Pediatria, Rio de Janeiro, v.80, n.2, 2004.

QUINNELL, R. J.; DYE, C. An experimental study of the peridomestic distribution of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae). Bulletin of Entomological Research, Cambridge, v.84, p.379-382, 1992.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology, London, v.136, p. 1915-1934, 2009.

RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.17, p. 221-227, 2001.

REINHOLD-CASTRO, K. R. et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.41, n.3, p. 269-276, mai./jun, 2008.

RESENDE, M. C. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 1, p. 51-55, jan/fev, 2006.

RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 9, p. 2246-2252, 1994.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. Journal of Parasitology, Lawrence, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, 2005.

SACKS, D. L; SILVA, R. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. Journal of Immunology, Baltimore, v.139, p. 3009-3106, 1987.

SAHA, S. et al. Visceral leishmaniasis is preventable in a highly endemic village in West Bengal, India. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v.103, n.7, p.737-742, jul. 2009.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology, St Albans, v. 12, n. 3, p. 315- 317, 1998.

SARAIVA, L. et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in na urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. Acta Tropica, Basel, v.117, p. 137-145, 2011.

SEAMAN, J. et al. Epidemic visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized trial of aminosidine plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v.168, p. 715-20, 1993.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471-478, jul./set, 1994.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A minireview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.102, n. 5, p. 541-547, ago, 2007.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.79, n.4, p.511, 1984.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, H. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, Brasília, v. 21, p. 541-548, 1969.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p.671-683, nov./dez, 1996.

SHERLOCK, I. A. Há especificidade dos flebotomíneos para as leishmânias? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 30, p. 359- 368, 1997

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p.285-291, abr. 2001.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. Veterinary Record, London, v. 147, p. 421 -422, 2000.

SILVA, D. F., VASCONCELOS, S. D. A ten year (1990-1999) survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco State, Northeastern Brazil. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v. 32, n.1, :53-61, 2003.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.40, n.4, p. 420-425, jul./ago, 2007.

- SILVA, J. G. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p. 1715-1720, 2007.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in the Amazonian Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.9, n.3. p. 239-251, maio. 2004.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. Journal of Postgraduate Medicine, Bombay, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.
- SOUZA, C. M. et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.99, n.8, p. 795-803, dez. 2004.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington DC, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.
- SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 123, p. 345-352, 2006.
- SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. Lancet, London, v. 1, p. 127-132, 1960.
- TEODORO, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extra florestais em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.27, n.4, p. 129-133, 1993.
- TEODORO, U. Características Ecológicas de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Habitats Antrópicos, Município de Jussara, Paraná, Brasil. 1995. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- TESH, R. B.; MODI, G. B. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 33, p. 41-46, 1984.
- VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive Vectors. Trends in Parasitology, London, v.23, n.3, p.91-92, 2007.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E.G. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.94, n.4, p. 427-432, jul./agst, 1999.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. Journal of Parasitology, Lawrence, v. 63, p. 1118-1119, 1977.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, p. 601-606, 2002.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute. v. 54, p. 1-881, 1994.

ZULETA, A. M. et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.61, p. 945-950, 1999.

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

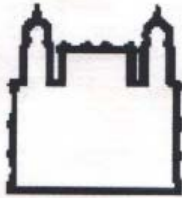
Certificamos que o Programa nº **P.0174-03**, intitulado “**Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão**” sob a responsabilidade da **Dr(a). Sinval Pinto Brandão Filho, CPqAM - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 25/04/05.

Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 25 de Abril de 2008.

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2005.


Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

ANEXO B – Termo Aditivo do Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DE LICENÇA Nº L-056/05

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – em atenção à solicitação do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, autoriza o presente Aditivo que altera a vigência desta licença, referente ao Protocolo intitulado: "Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão".

Ressaltamos que a nova data de validade desta licença é 25 de outubro de 2009.

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2009.


Dr^a. Norma Vollmer Laparthe

Coordenadora da CEUA

FIOCRUZ

ANEXO C - Autorização para atividades com finalidade científica



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: 12749-2	Data da Emissão: 13/12/2010 12:29
Dados do titular	
Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colonização de <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Gale a spixii</i> e <i>Rattus rattus</i>	08/2007	08/2012
2	Colonização de <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	08/2007	08/2012
3	Realização de ensaios de infecciosidade	08/2007	08/2012
4	Coleta de pequenos roedores e flebotomíneos	02/2011	08/2012

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.



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: 12749-2	Data da Emissão: 13/12/2010 12:29
Dados do titular	
Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, <i>Lutzomyia</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Rodentia (*Qtde: 10), <i>Lutzomyia</i> (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	<i>Lutzomyia</i>
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Rodentia

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	criadouro científico
2	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Instituição de pesquisa

APÊNDICE A – artigo publicado

Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil

Sinval P. Brandão-Filho¹✉, Maria Rita Donalisio², Fernando José da Silva¹, Hélio França Valença¹, Pietra Lemos Costa¹, Jeffrey J. Shaw³, A. Townsend Peterson⁴

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz. Av. Moraes Rego S/N, Recife-PE, Brazil

²Faculty of Medical Sciences/State University of Campinas, SP, Brazil

³Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil. 4. Biodiversity Institute, University of Kansas, Lawrence, Kansas U.S.A.

ABSTRACT: Sand fly populations of different ecological niches in the Amaraji endemic American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) focus of the Pernambuco Atlantic Forest region of northeastern Brazil were monitored spatiotemporally. *Lutzomyia whitmani* was dominant in all niches but occurred in smaller numbers in forested locations. *L. whitmani* was significantly less seasonal than the other species, being present throughout the year while other species were more abundant between February and April. These results suggest that *L. whitmani* may potentially be the principal vector of ACL in the region, even though the sand fly fauna was diverse: 88% were *L. whitmani* and 12% belonged to 11 other species. Two other species, *L. complexa* (1.3%) and *L. migonei* (0.8%), considered to be ACL vectors in other regions, were also present. This detailed picture of the sand fly population's abundance and spatiotemporal distribution provides a basis for future modeling studies of forecasting sand fly activity patterns and ACL occurrence. *Journal of Vector Ecology* 36 (Supplement 1): S71-S76. 2011.

Keyword Index: American cutaneous leishmaniasis, *Lutzomyia whitmani*, Atlantic forest, spatiotemporal distribution.

INTRODUCTION

In the New World, American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a zoonotic disease caused by different species of *Leishmania* and it is one of the most important health problems in Brazil, where some 35,000 cases occur each year (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2010). In humans, infections may be inapparent, but in others cases the clinical spectrum ranges from localized, often self-healing cutaneous lesions (CLs) to severe and mutilating mucocutaneous lesions (MCL) or diffuse CLs (Grimaldi and Tesh 1993, Carvalho et al. 1994). A particularly high prevalence of ACL has been reported in recent years in Pernambuco state, northeastern Brazil, in the vicinity of remnant patches of Atlantic forest (Brandão-Filho et al. 1999). The rapid increase in cases, coupled with evidence of peridomestic transmission at a number of sites (Campbell-Lendrum et al. 2001), has prompted calls for preventative measures to be added to the national control policy of diagnosis and treatment.

Phlebotomine sand fly species have been incriminated in transmission of ACL in the Americas (Marcondes 2001, Shaw 2002), and both epidemiological and experimental evidence indicate some degree of vector-parasite specificity. The enzootic cycle depends on close sand fly-reservoir contact and is considered a major factor limiting the geographic distribution of the disease. Although finding known vector species in new regions is interesting, detailed studies are required to determine their vectorial importance. An important step in this process is a better understanding of their distribution in different ecological niches during

the different seasons of the year.

Lutzomyia whitmani is one of the most important vectors of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Brazil (Rangel and Lainson 2009) and has been collected in large numbers in the Atlantic Forest region of Pernambuco (in Portuguese *Zona da Mata*), in the municipality of Amaraji. It has also been found infected naturally with *L. (V.) braziliensis* in this region and the parasites belong to a zymodeme found in both humans and mammalian reservoir hosts in the same area. These observations add considerable weight to conclusions regarding its importance as a vector of zoonotic ACL cycle in this region (Brandão-Filho et al. 2003, Brito et al. 2009).

The aim of the present study is to provide additional data on the ecology of sand flies in the Amaraji region. We summarize one year's detailed sampling of sand flies in different ecological niches of a highly endemic ACL region in the Atlantic Forest zone of eastern Pernambuco. Unlike similar studies in other foci, our sampling was performed simultaneously at different sites and repeated throughout the year, allowing evaluation of occurrence patterns in both dimensions simultaneously. Only via such intensive sampling is it possible to understand their activity and consequently their vector potential. The present paper is the first major step in the analysis of this extensive data set.

MATERIALS AND METHODS

Sand flies were captured using ten CDC light traps with incandescent light sources set in different ecological niches during 4 successive days each month. The study was

carried out in the localities of Refrigerio and Tranquilidade, in the Amaraji municipality (8°22'59"S 35°27'09"W, 289 m), Pernambuco state (Figure 1). Sampling occurred in nine sessions during 2009 represented by a total of 256 trap-nights. A village or ranch was visited and sampled every second month, which permitted large numbers of sites to be sampled and different types of sites visited in alternating pairs of months. In this area, small patches of rainforest are surrounded by extensive areas of sugar cane and banana plantations, which are the dominant cash crops for the local people. Traps were positioned in places previously chosen, corresponding to sites in remnant forest patches, in plantations, and around houses (peridomicile). Sites for traps were recorded in the field using a hand-held Garmin (eTrex® HC series model) global positioning system, accurate to ~10 m on the ground. Field samples were stored separately by trap and night, permitting detailed tracking of the spatial dimensions of the occurrence of each individual sand fly captured.

Once field sampling was completed each month, each sand fly captured was identified to species. These data were summarized in various manners, visualizing patterns of occurrence of each species through time and space.

We tested for differences in seasonality of occurrences between the most common species and the next-less-common species by the following rarefaction procedure. For the less-common species, we calculated the proportion of positive trap nights for each month, and calculated the standard deviation of these monthly proportions through the year. For the more-common species, of the positive trap-nights, we sub-sampled 100 times positive trap-nights at random in numbers matching the number of positive trap-nights for the less-common species, and calculated the standard deviation of the monthly proportions through the year for each of the 100 replicates. Finally, we compared the observed value for the less-common species with the distribution of rarefied replicate values for the more-common species to establish a one-tailed probability distribution for the comparison. We linked seasonality of sand fly occurrences qualitatively to seasonal climatic variation by comparison with regional climate interpolations at 0.17° spatial resolution (Hijmans et al. 2005).

RESULTS

Table 1 summarizes captures of the various *Lutzomyia* species over the study region and through the study period. *L. whitmani* was the dominant species, with 1,191 individuals, constituting 88.0% of the total of sand flies captured. This overwhelming abundance was particularly intense near rural buildings and domiciles, with 93% of the total; in forested situations, *L. whitmani* still dominated, but with only 42% of the total. The dominance of this species was almost total near rural buildings, as the next-most-common species, *L. evandroi*, constituted only 5.0% of the total captures, and the remaining ten species only accounted for 7.0% of the total. Other species, such as *L. evandroi*, *L. quinquefer*, and *L. migonei*, were found in small numbers

at sites near rural buildings occasionally. In forested sites, *L. whitmani* continued to be the dominant species, but here *L. evandroi*, *L. tupynambai*, and *L. complexa* were taken. Although the sand fly fauna of the Amaraji region is diverse, with 12 species detected, it is nonetheless quite monospecific functionally. The 21 trap-nights in which sampling was unsuccessful represented 8.3% of the total set of trapping nights.

Seasonal patterns of occurrence contrasted between *L. whitmani* and the remaining species. *L. whitmani* was found in every sampling period, in the forest and near anthropogenic sites, with the greatest numbers being taken in March. However, the numbers of this species were also moderate to high in samples from June–October (i.e., >35 individuals in each monthly sample). In contrast, occurrences of the remaining species were highly concentrated in the period between February and April; only 41 individuals of any species other than *L. whitmani* were captured after April. The rarefaction-based comparisons of captures of *L. whitmani* and *L. evandroi* (the second-most-common species) indicated that *L. whitmani* is significantly less seasonal than *L. evandroi*. This period of concentrated occurrence from February to April coincided with the initiation of the yearly rainy season, although occurrences dropped off by May and June, which are the actual peak months of rain.

The spatial distribution of sand fly captures was also highly heterogeneous and variable (Figure 2). For example, *L. whitmani* occurred more frequently in the northeastern-most sites as well as in a few scattered localities of four other northern sites. However, none of the southwestern sites yielded specimens of this species and it was also absent in several other sites, including two sets close to the northeastern-most sites. *L. evandroi* was also taken frequently in the northeastern sites and was found at only one other site across the entire region. The remaining species showed a pattern similar to that of *L. evandroi*, being present in several northeastern sites and in only two other sites in the entire sample set.

DISCUSSION

Many Brazilian species of *Lutzomyia* have been associated with ACL transmission. In this study, we identified 12 species, some of which have been previously incriminated as competent leishmaniasis vectors. This diverse sand fly community is nonetheless dominated by the known vector species *L. whitmani*.

Our sampling at Amaraji shows that *L. whitmani* is the dominant presence throughout the year, particularly at sites near rural houses and other human facilities. Species diversity of sand flies was higher at forested sites than near human buildings, where *L. whitmani* was so dominant. *L. whitmani* has been perhaps the species most frequently connected to ACL transmission in the west-central, northern, and northeastern parts of Brazil. It has been captured in Brazil in many endemic ACL areas, in different vegetation and climate contexts (Costa et al. 2007,

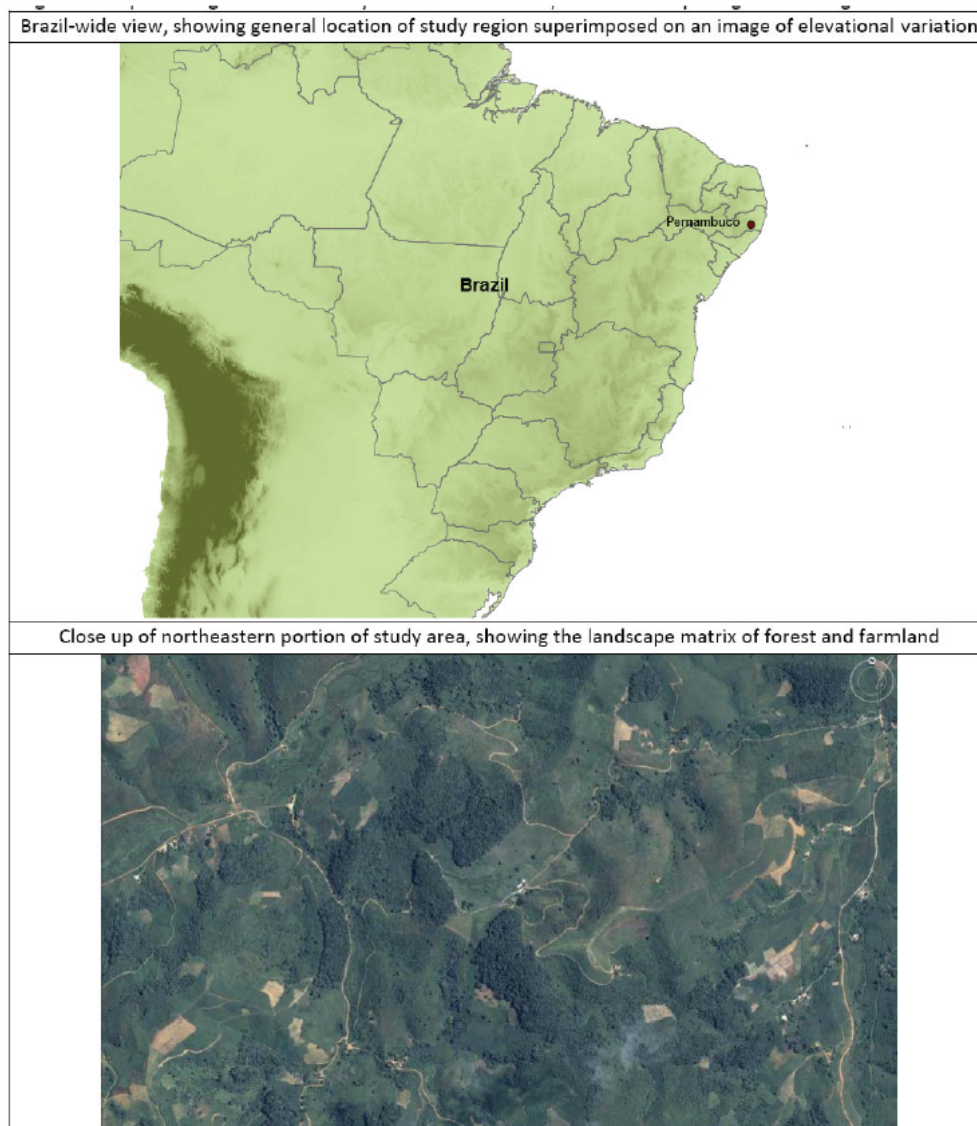


Figure 1. Map showing location of study area in Pernambuco, Brazil. Close up image from Google Earth.

Zeillhofer et al. 2008, Souza et al. 2002, Peterson and Shaw 2003, Queiroz et al. 1994). More recently, several studies have indicated the increasing adaptation of *L. whitmani* to peridomestic sites: this trend would seem to be a positive response to human encroachment linked to deforestation (Costa et al. 2007, Campbell-Lendrum et al. 2000, Brandão-Filho et al. 2003, Souza et al. 2002, Teodoro et al. 1999). Another species, *L. migonei*, is also known to be involved in peridomestic ACL transmission in many regions of

Brazil (Queiroz et al. 1994, Mayo et al. 1998, Azevedo and Rangel 1991), although it was uncommon in our samples.

L. evandroi and *L. quinquefer* have been captured near domestic animal shelters and peridomestic situations, but they have never been incriminated as vectors for human leishmaniasis. (Ximenes et al. 1999, Souza et al. 2002). Others species captured in the Amaraji region, such as *L. fischeri*, *L. longispina*, and *L. sordellii* (Souza et al. 2002, Luz et al. 2000, Mayo et al. 1998), have been encountered

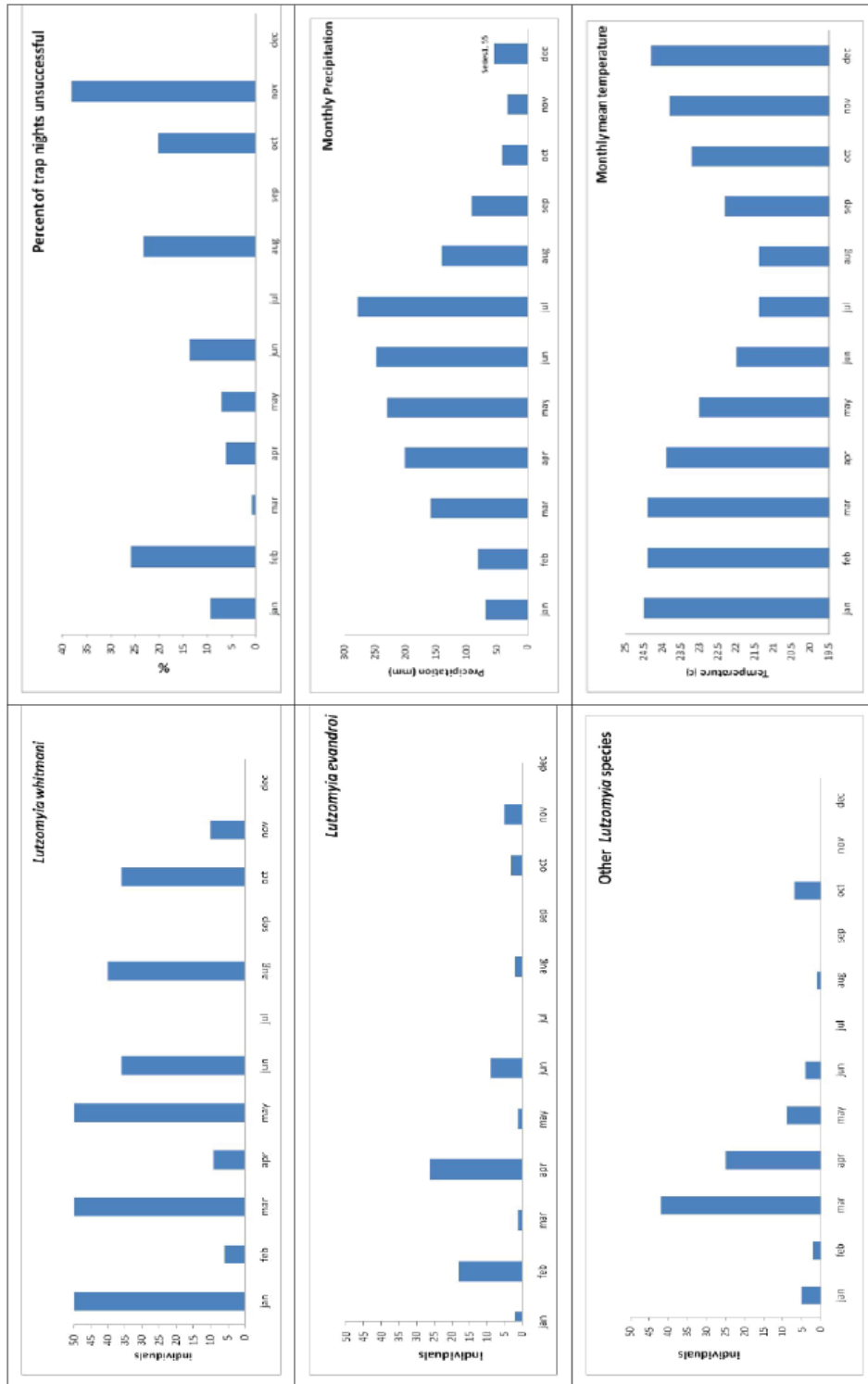


Figure 2. Monthly trends in trap success (in terms of number of individuals for *Lutzomyia whitmani*, *L. evandroi*, and other species; also shown are percentage of trap-nights yielding no captures ("negatives"), and yearly trends in mean annual temperature and annual precipitation. Note that occurrences of *L. whitmani* in January, March, and May exceed the maximum visible in the chart, with 186, 716, and 152 individuals captured, respectively.

in peridomestic habitats and forested environments in cutaneous and visceral leishmaniasis endemic areas.

Simultaneous monthly sand fly captures in different ecological niches throughout the year enabled us to evaluate species diversity, seasonality, and abundances at different sites in different environments. As in other sand fly studies in the Brazilian cerrado and forested environments (Costa et al. 2007, Campbell-Lendrum et al. 2000, Luz et al. 2000), we found minimal seasonality of *L. whitmani* in Amaraji, although it was taken in greater numbers between March and June, when precipitation is increasing in the region. Increasing the frequency of sampling could result in clearer definition of peaks of abundance and better association with climatic events. Determining seasonal trends of sand fly populations is difficult since high variability characterizes nightly capture rates. *L. whitmani* was also seen to be most associated with peridomestic environments, emphasizing its potential vectorial importance to humans within these habitats. Curiously, in Mato Grosso do Sul, no marked seasonality was observed in this species, and it was present in larger numbers in forested habitats rather than in anthropogenic sites (Galati et al. 1996).

Seasonality was most evident in samples from forested sites, with captures of all species concentrated in March through May at the beginning of the rainy season. Besides *L. whitmani*, other common species included *L. evandoi*, *L. tupynambai*, and *L. complexa*. The latter species has been identified as an important vector associated with autochthonous ACL transmission in Para state, in the Amazon region, and other Atlantic Forest sites in Pernambuco (Souza et al. 1996, Andrade et al. 2005, Carvalho et al. 2007). Our results nonetheless reinforce the role of *L. whitmani* as the dominant vector of ACL transmission in this region, as even in samples at forested sites, it was the dominant species.

L. whitmani populations have been studied and characterized in terms of host and site preferences, dispersal, genetic variation, and natural infection rates (Campbell-Lendrum et al. 1999a,b). *L. whitmani* were significantly more attracted to humans than to dogs or chickens, showing very anthropophilic behavior. Experimental comparisons of anthropophily between geographically separated populations of this species have been developed (Campbell-Lendrum et al. 1999b, 2000). Comparing levels of anthropophily between sand fly species and populations of the same species from different geographical regions is complicated due to variations in their relative density. With these limitations in mind it would seem that the North-South and Amazonian mitochondrial lineages of *L. whitmani* are more anthropophilic than the North-Eastern lineage. Intraspecific comparisons among non-Amazonian sites suggest that *L. whitmani* is less anthropophilic than *L. intermedia* but more so than *L. longipalpis* (Brazil et al. 1991, Campbell-Lendrum et al. 1999a).

The combination of present and past studies on the biology of *L. whitmani* reinforce its status as the principal vector of ACL in peridomestic and degraded forest habitats in the Atlantic rainforest zone of Pernambuco state.

Such data sets will also enable us to make spatial associations of sand fly distributions with ACL cases, characterization of sand fly ecological niches, and forecasting of seasonal spatial activity patterns.

Acknowledgments

This study was supported financially by grant from CNPq (410481/2006-8).

REFERENCES CITED

- Andrade, M.S., H.F. Valença, A.L. Silva, F.A. Almeida, E.L. Almeida, M.E.F. Brito, and S.P. Brandão-Filho. 2005. Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 21: 1761-1767.
- Azevedo, A.C.R. and E.F. Rangel. 1991. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86: 405-410.
- Brandão-Filho, S.P., M.E.F. Brito, F.G. Carvalho, E. Ishikawa, E. Cupolillo, L.M. Floeter-Winter, and J.J. Shaw. 2003. 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.* 97: 291-296.
- Brandão-Filho, S.P., D. Campbell-Lendrum, M.E.F. Brito, J.J. Shaw, and C.R. Davies. 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 488-494.
- Brazil, R.P., I.E. Morton, and R.D. Ward. 1991. Notes of the feeding habitats of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Ceara State, Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86: 497-498.
- Brito, M.E.F., M.S. Andrade, M.G. Mendonça, C.J. Silva, E.L. Almeida, B.S. Lima, S.M. Felix, F.G. Abath, G.C. da Graca, R. Porrozi, E.A. Ishikawa, J.J. Shaw, E. Cupolillo, S.P. Brandão-Filho. 2009. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop. Med. Intl. Hlth.* 14: 1278-1286.
- Campbell-Lendrum, D., S.P. Brandão-Filho, M.C. Pinto, P.D. Ready, and C.R. Davies. 2000. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. *Bull. Entomol. Res.* 90: 41-48.
- Campbell-Lendrum, D., S.P. Brandão-Filho, P.D. Ready, C.R. Davies. 1999a. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.* 13: 209-211.
- Campbell-Lendrum, D., J.P. Dujardin, E. Martinez, M.D. Feliciangeli, J.E. Perez, L.N.M. Passerat de Silans, and P. Desjeux. 2001. Domestic and peridomestic

- transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 159-162.
- Campbell-Lendrum, D., M.C. Pinto, S.P. Brandão-Filho, A. Souza, P.D. Ready, and C.R. Davies. 1999b. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). Med. Vet. Entomol. 13: 299-309.
- Carvalho, E.M., A. Barral, J.M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 56: 315-325.
- Carvalho, M.R., B.S. Lima, J.F. Marinho Júnior, F.J. Silva, H.F. Valença, E.A. Almeida, A.L. Silva, and S.P. Brandão-Filho. 2007. Phlebotomine sandflies species from American visceral leishmaniasis in the North Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cad. Saúde Pública. 23: 1227-1232.
- Costa, S.M., M. Cechinel, V. Bandeira, J.C. Zannuncio, R. Lainson, E.F. Rangel. 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American Cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102: 149-153.
- Galati, E.A.B., V.L.B. Nunes, M.E.C. Dorval, E.T. Oshiro, G. Cristaldo, M.A. Espíndola, H.C. da Rocha, and W.B. Garcia. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Saúde Pública. 30: 115-128.
- Grimaldi, G., Jr. and R.B. Tesh. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev. 6: 230-250.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, and A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Intern. J. Clim. 25: 1965-1978.
- Luz, E., N. Membrive, E.A. Castro, J. Dereure, F. Pralong, J.A. Dedet, A. Pandey, and V. Thomaz-Soccol. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* in Parana state, southern Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol. 94: 623-631.
- Marcondes, C.B., L.G. Santos-Neto, and A.L. Lozovei. 2001. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34: 255-260.
- Mayo, R.C., C. Casanova, L.M. Mascarini, M.G. Pignatti, O. Rangel, and E.A.B. Galati. 1998. 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. 31: 339-345.
- Peterson, A.T. and J. Shaw. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. Int. J. Parasitol. 33: 919-31.
- de Queiroz, R., I.A.B. Vasconcelos, A.W. Vasconcelos, E.A.C. Pessoa, R.N. Sousa, and J.R. David. 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceara State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 693-698.
- Rangel, E.F. and R. Lainson. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 937-954.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministerio da Saude, Brasil. 2010. Bol. Epidemiol. Eletrônico 10: 2-24.
- Shaw, J.J. 2002. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: *Leishmania: World Class Parasites*, Vol IV., S.J. Black and J.R. Seed (eds.) Kluwer Academic Publishers, U.S.A. 193 pp.
- Souza, A., E. Ishikawa, R. Braga, F. Silveira, R. Lainson, and J.J. Shaw. 1996. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90: 112-113.
- Souza, N.A., C.A. Andrade-Coelho, M.L. Vilela, A.V. Peixoto, and E.F. Rangel. 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 759-765.
- Teodoro, U., J.B. Kühl, D.R. Santos, and E.S. Santos. 1999. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. Cad. Saúde Pública. 15: 901-906.
- Ximenes, M.F.F.M., M.F. Souza, and E.G. Castellon. 1999. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 427-432.
- Zeilhofer, P., O.P. Kummer, E.S. Santos, A.L. Ribeiro, and N.A. Missawa. 2008. Spatial modelling of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) habitat suitability in the state of Mato Grosso, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103: 653-660.