

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

Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais.

por

Aline Tanure

Belo Horizonte

2017

ALINE TANURE

Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais.

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

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Belo Horizonte

2017

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

T161 e Tanure, Aline.
2017

Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais / Aline Tanure. – Belo Horizonte, 2017.

xix, 92 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 83 - 101

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

1. Leishmaniose/transmissão 2.
Leishmania/parasitologia 3. Psychodidae/classificação
I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando
(Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

ALINE TANURE

Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais.

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

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

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

Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata (UFVJM) Titular

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

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 20/02/2016.

Dedico este trabalho à minha família e
à todos que me ajudaram a torná-lo possível.

*" Depois de muitas quedas, eu descobri que, às vezes,
quando tudo dá errado, acontecem coisas tão
maravilhosas que jamais teriam acontecido se tudo
tivesse dado certo." (Mário Quintana).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e força para concluir com louvor mais esta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Maria de Lourdes e Youssef, pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e pelas palavras de incentivo sempre ditas nas horas certas, mesmo que à distância. Agradeço também à minha irmã companheira de vida, Lívia, por estar sempre ao meu lado fazendo os meus dias mais leves! Amo vocês, minha família!

Agradeço à todos os meus familiares pelo incentivo e torcida para que eu alcançasse o sucesso.

Ao Rafael, pelo apoio presencial ou à distância, agradeço por acreditar em mim, por me incentivar e torcer sempre pelo meu sucesso. Agradeço pelo amor, companheirismo, pelos conselhos e por sempre me arrancar um sorriso todos os dias. Obrigada por me completar e fazer dos meus dias mais felizes. Amo você!

Ao meu orientador Dr. José Dilermando, ou Leco, por ser um excelente orientador. Obrigada pela convivência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo enorme aprendizado esses anos e por fazer parte de tudo isso. Obrigada também pela paciência e compreensão em diversos momentos. Agradeço pela enorme disposição em me ajudar, pelas risadas e brincadeiras que fizeram tudo ser mais leve e despreocupante, apesar das dificuldades. Boa parte do que eu sou e sei hoje se deve à você! Agradeço de coração por ter sido sua orientanda!

Agradeço à Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo por abrir as portas do laboratório do Grupo de Estudos em Leishmanioses, por estar sempre disposta a ajudar com seu grande conhecimento, e por ser essa pessoa leve e agradável de se conviver.

Agradeço também à Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro pela ajuda na identificação dos flebotomíneos, nas análises de sequenciamento e pela experiência trocada. Sua ajuda foi de fundamental importância para construção deste trabalho!

Agradeço ao Msc. Felipe Dutra Rêgo pela enorme ajuda em todas as etapas deste projeto. Desde as coletas de campo, montagem e identificação dos flebotomíneos,

correções de trabalhos e principalmente na parte de biologia molecular. Obrigada pela paciência, por sempre estar disposto a me ajudar em todos os momentos. Você com certeza foi muito importante para que tudo isso fosse concluído. Obrigada!

Ao Gustavo Fontes Paz por ter sido o “intermediador” para que eu pudesse dar início a tudo isso no CPqRR. Obrigada pela paciência, ajuda no desenvolvimento do projeto de mestrado e pelos bate papos descontraídos.

Agradeço ao Gustavo Mayr pelos conselhos na vida pessoal e profissional. Agradeço pela ajuda na escrita dos artigos e confecção dos gráficos, e por estar disposto a ajudar sempre que precisei. Muito obrigada!

Ao Gabriel Tonelli que se dispôs a ajudar nos trabalhos de campo, montagem, extração e PCR de flebotomíneos.

Agradeço à todos do CRNIF pela ajuda e suporte na montagem e dissecação dos flebotomíneos. Agradeço pela convivência, troca de experiências, risadas e amizades contruídas ao longo desses anos. Em especial às minhas amigas Aldenise e Alanna que sempre estiveram comigo nessa caminhada, dando apoio necessário e torcendo pelo meu sucesso, obrigada minhas amigas! Agradeço a Juliana e Mariana pela convivência e risadas, fazendo os dias mais leves.

A todos os colegas do Grupo de Estudos em Leishmanioses, meu muito obrigada pela ajuda em todos os momentos! Júlia, Tina, Agnes, obrigada pela convivência agradável todo esse tempo. Agradeço ao Jerônimo Rugani pela ajuda no sequenciamento de DNA e pelas risadas e conversas! Agradeço também às ex alunas de iniciação científica Gabriela, Thaís e Ana Carolina pela ajuda nas extrações de DNA e PCR das fêmeas alimentadas.

Agradeço à Dra. Janaína por me fornecer os dados de casos humanos de leishmanioses do município de Brumadinho, pela prestatividade e bom humor.

A minha turma de mestrado em Ciências da Saúde 2015/1 agradeço pelos maravilhosos momentos de aprendizado e amizade que construímos! Obrigada por caminharmos juntos nessa jornada e pela convivência agradável dentro e fora do CPqRR. Em especial, minhas amigas Mariana e Khaterine, obrigada por fazerem parte de tudo isso!

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, CPqRR-FIOCRUZ pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido ao logo desses dois anos.

Agradeço aos órgãos de fomento: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da minha bolsa; Às instituições que financiaram este projeto: FAPEMIG e CNPq; e agradeço a Plataforma de sequenciamento de DNA/ RPT01E do CPqRR por ceder a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos de sequenciamento.

Aos moradores do distrito de Casa Branca, agradeço pela recepção sempre educada em todos os meses de coleta, por disponibilizarem suas casas para a realização deste trabalho. Vocês foram de fundamental importância e espero que este trabalho possa beneficiá-los de alguma forma.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que estiveram comigo, apoiando, incentivando mesmo que à distância, e torcendo pelo meu sucesso! Familiares, amigas da faculdade, amigas de infância, colegas, agradeço por cada palavra de incentivo que me foi dada, com certeza foi de grande importância para que eu pudesse ter mais força de vontade e chegar a conclusão desta etapa da minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são doenças endêmicas em vários países do mundo, incluindo o Brasil e são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. O conhecimento sobre os vetores dessas doenças, os flebotomíneos, pode auxiliar no delineamento das medidas de controle da doença em determinados locais. O objetivo deste trabalho foi estudar a fauna de flebotomíneos, verificar a presença de DNA de *Leishmania* nas fêmeas capturadas e verificar a alimentação sanguínea nas fêmeas ingurgitadas coletadas na localidade de Casa Branca, pertencente ao município de Brumadinho, Minas Gerais. Durante o período de maio de 2013 a julho de 2014 foram realizadas coletas bimensais totalizando oito coletas sistematizadas de flebotomíneos utilizando 18 armadilhas luminosas expostas no peridomicílio de nove casas, selecionadas por apresentarem casos de leishmanioses humana ou canina. A fauna de flebotomíneos foi composta por 23 espécies, com um total de 16.771 flebotomíneos capturados, sendo a espécie *Nyssomyia whitmani* a mais abundante na área de estudo, seguida por *Lutzomyia longipalpis* e *Migonemyia migonei*. As fêmeas não alimentadas pertencentes às coletas dos meses de maio/2013, setembro/2013, janeiro/2014 e maio/2014 foram dissecadas e colocadas em pools de no máximo 20 indivíduos onde foi feita a extração de DNA e posterior pesquisa de DNA de *Leishmania* por meio da técnica de PCR dirigida ao alvo ITS1. As espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos detectados nos pools das fêmeas de flebotomíneos neste estudo foram identificados através da técnica de sequenciamento genético do produto amplificado. Foi possível detectar DNA de *Leishmania* em nove pools: *Lu. longipalpis* (1), *Ny. whitmani* (6) e *Psychodopygus lloydi* (2). Outros tripanossomatídeos foram detectados em 10 pools: *Crithidia* sp. em 1 pool de *Ps. lloydi*, *Endotrypanum* sp. em 6 pools de *Ny. whitmani* e *Herpetomonas* sp. nas espécies *Ny. whitmani* (3 pools) e no complexo *cortezzi* (1 pool). As fêmeas alimentadas foram dissecadas e o DNA foi extraído para posterior identificação de fontes alimentares através da PCR dirigida ao gene do citocromo b com a confirmação pelo sequenciamento genético. Foram detectadas as fontes alimentares *Canis familiaris*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens* e *Rattus rattus*, e a espécie *Ny. whitmani* foi a mais abundante capturada alimentada no peridomicílio. Os resultados da pesquisa de DNA de *Leishmania* chamam atenção para a presença das espécies de importância médica como *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* presentes na área de

estudo detectadas com *Leishmania*, reforçando seus papéis na epidemiologia das leishmanioses. Os outros tripanossomatídeos detectados nesse estudo mostram que pela PCR-ITS1 foi possível detectar outras espécies da família Trypanosomatidae além de *Leishmania*, evidenciando que essas espécies estão presentes na área de estudo. Os resultados do estudo das fontes alimentares mostraram que os flebotomíneos estão adaptados ao peridomicílio se alimentando em animais comuns a este ambiente.

Palavras-chave: Phlebotominae, Leishmanioses, Transmissão.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease in several countries in the world, including Brazil and is caused by parasites of the genus *Leishmania*. Knowledge about sand flies vectors may help in the design of disease control measures in certain locations. The objective of this work was to study the fauna of sand flies, to verify the presence of *Leishmania* DNA in the captured females and to verify the blood source in the collected females in the locality of Casa Branca, belonging to the municipality of Brumadinho, Minas Gerais. During the period from May 2013 to July 2014, bimonthly collections were carried out totaling eight systematized collections of sand flies using 18 light traps exposed in the peridomicile of nine houses selected for presenting cases of human or canine leishmaniasis. The fauna of sand flies was composed of 23 species, being a total of 16,771 sandflies captured, being the species *Ny. whitmani* the most abundant in the study area, followed by *Lutzomyia longipalpis* and *Migonemyia migonei*. The females belonging to the collections of May/2013, September/2013, January/2014 and May/2014 were dissected and placed in pools of a maximum of 20 individuals where the extraction of DNA and subsequent DNA analysis of *Leishmania* by means of the ITS1 targeting PCR technique. The species of *Leishmania* and other trypanosomatids detected in the pools of sand flies females in this study were identified through the genetic sequencing technique of the amplified product. It was possible to detect *Leishmania* DNA in nine pools: *Lu. longipalpis* (1), *Ny. whitmani* (6) and *Psychodopygus lloydi* (2). Other trypanosomatids were detected in 10 pools: *Crithidia* sp. in one pool of *Ps. lloydi*, *Endotrypanum* sp. in six pools of *Ny. whitmani* and *Herpetomonas* sp. in three pools of *Ny. whitmani* and one pool of complex *cortelezzii*. The fed females were dissected and the DNA was extracted for further identification of blood meal sources by PCR directed to the Cytochrome b gene with confirmation by genetic sequencing. Food sources *Canis familiaris*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens* and *Rattus rattus* were detected. The specie *Ny. whitmani* was the most abundant captured fed in the peridomicile. The results of *Leishmania* DNA research and the abundance call attention to the presence of species of medical importance as *Lu. longipalpis* and *Ny. whitmani* present in the study area detected with *Leishmania*, reinforcing their roles in the epidemiology of leishmaniasis. The other trypanosomatids detected in these studies show that by PCR-ITS1 it was possible to detect other species of the family Trypanosomatidae besides *Leishmania* genus, evidencing that these species are

present in the study area. The results of the study of feeding sources showed that sand flies are adapted to the peridomicile feeding on animals common to this environment.

Key-words: Phlebotominae, Leishmaniasis, Transmission.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização do distrito de Casa Branca, no município de Brumadinho, Minas Gerais..... 33
- Figura 2:** Imagem da localização do distrito de Casa Branca em relação aos municípios vizinhos e o Parque Estadual Serra do Rola Moça, no estado de Minas Gerais. 33
- Figura 3:** Distribuição dos pontos de coleta de flebotomíneos no distrito de Casa Branca, município de Brumadinho, Minas Gerais. 34
- Figura 4:** Peridomicílio de algumas residências escolhidas para exposição das armadilhas para coleta de flebotomíneos em Casa Branca, Brumadinho durante o período de maio de 2013 a julho de 2014. 35
- Figura 5:** Porcentagem das espécies de flebotomíneos capturadas no peridomicílio no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais. 46
- Figura 6:** Distribuição mensal das espécies vetoras e demais espécies de flebotomíneos capturadas durante os meses de coleta no peridomicílio das residências de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014. 48
- Figura 7:** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da PCR-ITS1 de alguns pools de fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio das de Casa Branca, Brumadinho no período de maio de 2013 a julho de 2014. Canaletas: PM 100pb – peso molecular de 100pb; 01 a 05 pools das fêmeas de flebotomíneos; CP1 – controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); CP2 – Controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); CP3 – controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); CP4 – controle positivo de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CP5 – controle positivo *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048); Cp6 – controle positivo *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151); CP7 – controle positivo *Leptomonas collosoma* (COLPROT 073); CP8 – controle positivo *Herpetomonas samuelpessoai* (COLPROT 067); CP9 – controle positivo *Phytomonas serpens* (COLPROT 189); e CN – controle negativo (apenas reagentes da PCR sem DNA). 56
- Figura 8:** Gel de agarose 4% corado com brometo de etídio mostrando produtos digeridos da PCR-RFLP do alvo ITS1 de alguns pools de fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio de Casa Branca no período de maio de 2013 a julho de 2014. Canaletas: PM 100pb – peso molecular de 100pb; 01 a 05 pools das fêmeas de flebotomíneos; CP1 – controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); CP2 – Controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); CP3 – controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); CP4 – controle positivo de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CP5 – controle positivo *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048); Cp6 – controle positivo *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151); CP7 – controle positivo *Leptomonas collosoma* (COLPROT 073); CP8 – controle positivo *Herpetomonas samuelpessoai* (COLPROT 067); CP9 – controle positivo *Phytomonas*

serpens (COLPROT 189); e CN – controle negativo (apenas reagentes da PCR sem DNA). 59

Figura 9: Árvore mostrando a relação entre tripanossomatídeos detectados nos pools das fêmeas de flebotomíneos inferida pelo método Neighbor-Joining. 60

Figura 10: Porcentagem das espécies de fêmeas alimentadas de flebotomíneos mais capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.62

Figura 11: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados da PCR do Cyt b a partir da extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos individuais coletadas no peridomicílio de Casa Branca, Minas Gerais. Canaletas: PM – Peso molecular 100pb; 1 – macho de *Lu. longipalpis* (controle negativo interno); 2 a 13 – fêmeas de flebotomíneos capturadas com sinais de ingurgitamento; CP – controle positivo (amostras de sangue de cão); CN – controle negativo (apenas reagentes da PCR sem DNA). 62

Figura 12: Porcentagem dos hospedeiros vertebrados identificados como fontes alimentares para fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais. 63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Índice padronizado de abundância das espécies coletadas no peridomicílio de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais..... 51
- Gráfico 2:** Relação da variação sazonal entre o número das espécies de flebotomíneos mais capturados no peridomicílio e as variáveis climáticas no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Minas Gerais. 52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição do peridomicílio das residências selecionadas para coleta de flebotomíneos em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais no período de maio de 2013 a julho de 2014.	36
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Flebotomíneos capturadas no peridomicílio das residências do distrito de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais no período de maio de 2013 a julho de 2014.....45
- Tabela 2:** Distribuição mensal de flebotomíneos no peridomicílio das residências de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.47
- Tabela 3:** Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados de acordo com sexo e pontos de coleta em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.50
- Tabela 4:** Espécies de fêmeas de flebotomíneos analisadas em pools e individualmente coletadas no peridomicílio no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.53
- Tabela 5:** Detecção de DNA e identificação de espécies de Trypanosomatidae nas fêmeas de flebotomíneos de acordo com o número do pool e data de coleta em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, de maio de 2013 a julho de 2014.55
- Tabela 6:** Espécies de fêmeas de flebotomíneos detectadas com DNA de Trypanosomatidae coletadas em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.58
- Tabela 7:** Espécies de fêmeas alimentadas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.61
- Tabela 8:** Total de fêmeas de flebotomíneos capturadas alimentadas e as espécies de vertebrados identificados a partir da análise do sangue ingerido, Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ L: microlitro

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CP: controle positivo

CN: controle negativo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

Ev: *Evandromyia*

EL: Estudos em Leishmanioses

ELISA: Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

Id: identidade

ITS1: *Internal Transcribed Spacer 1*

Km²: Quilômetro quadrado

Le: *Leishmania*

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu: *Lutzomyia*

LV: Leishmaniose Visceral

MG: Minas Gerais

Mg: *Migonemyia*

mM: milimolar

ng: nanogramas

Ny: *Nyssomyia*

Pb: pares de bases

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Lenght Polymorphism*

Pi: *Pintomyia*

PM: Peso molecular

pmol: pico mols

Ps: *Psychodopigus*

Qc: query cover

Ref: referência

Rpm: rotação por minuto

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses.....	20
1.2 Biologia e Ecologia dos Flebotomíneos.....	22
1.3 Estudos para detecção de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos	25
1.4 Estudo do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Área de Estudo.....	32
4.2 Estudo da fauna de flebotomíneos	34
4.2.1 Coleta de flebotomíneos.....	34
4.2.2 Processamento do material coletado.....	37
4.2.3 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos.....	37
4.3 Dados climáticos	38
4.4 Avaliação ecológica e análise dos dados	38
4.5 Detecção de infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	38
4.5.1 Extração de DNA das fêmeas não alimentadas	39
4.5.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer (ITS1)	40
4.5.3 Reação de sequenciamento	41
4.5.4 Construção da árvore Neighbor-joining.....	42
4.6 Detecção da fonte alimentar das fêmeas com sinais de repasto	42
4.6.1 Extração de DNA das fêmeas alimentadas.....	42
4.6.2 PCR dirigida ao gene do Cytocromo b de vertebrados (<i>Cyt b</i>)	42
5 RESULTADOS	44
5.1 Estudo da fauna de flebotomíneos	44
5.2 Estudo de detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos	52
5.3 Identificação de fonte alimentar sanguínea das fêmeas de flebotomíneos	61
6 DISCUSSÃO	66
6.1 Fauna de flebotomíneos.....	66
6.2 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos	71
6.3 Identificação de fontes alimentares sanguíneas de fêmeas de flebotomíneos.....	77
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas consideradas um grande problema de saúde pública, com considerável importância médica por terem ampla distribuição geográfica, além de apresentarem alta incidência na população humana (WHO, 2015).

São doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* Ross, 1903, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O parasita *Leishmania* se apresenta sob duas formas básicas: a forma flagelada denominada promastigota encontrada em hospedeiros invertebrados e a forma amastigota sem flagelo, encontrada no interior de células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado (Ward, 1985; Lainson & Shaw, 1987).

As espécies de parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas hematófagas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae (Galati, 2003) conhecidos como flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Killick-Kendrick, 1990). Alguns gêneros no Novo Mundo (*Lutzomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia*, *Nyssomyia*, dentre outros) estão envolvidos na veiculação desses parasitos (Brazil et al., 2015).

Atualmente são conhecidas cerca de 21 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem (WHO, 2015). Essas espécies estão divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, classificados de acordo com o seu desenvolvimento no trato digestório do inseto vetor flebotomíneo (Lainson & Shaw, 1987). Espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e intestino anterior de seus vetores (desenvolvimento suprapilário), e espécies do subgênero *Viannia* tem desenvolvimento peripilário (Lainson & Shaw, 1987).

O gênero *Leishmania* no Novo Mundo compreende várias espécies que são agentes causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo as espécies do subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (V.) *colombiensis*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *peruviana*, L. (V.) *panamensis*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *shawi* e L. (V.) *lindenbergi*; Já as espécies do subgênero *Leishmania* são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, L. (L.) *mexicana*, L. (L.)

venezuelensis, *L. (L.) pifanoi* (Lainson, 2010). A principal espécie causadora da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo é a *Leishmania infantum*, pertencente ao subgênero *Leishmania* (Mauricio, 2000).

No cenário atual, 98 países e territórios têm registros de casos de leishmanioses e cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália Sudão do Sul e Sudão, com estimativa de que ocorram anualmente em torno de 200 mil a 400 mil novos casos de LV (WHO, 2015). A leishmaniose tegumentar acomete em torno de 700 mil a 1,2 milhões de pessoas por ano em todo mundo, e 90% dos casos estão concentrados em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe Síria, Tunísia e Iemen (WHO, 2015). Por ser uma doença de maior ocorrência em países considerados pobres ou em desenvolvimento, as leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas (Desjeux, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde as leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas: a leishmaniose tegumentar que acomete a pele; a forma muco-cutânea que atinge pele e mucosas podendo causar lesões desfigurantes na face; a leishmaniose cutâneo-difusa que pode disseminar-se por todo corpo; e a leishmaniose visceral que acomete as vísceras, sendo a forma mais grave da doença podendo levar a óbito em casos não tratados (WHO, 2015).

A LTA está difundida por todas as regiões do Brasil (Brasil, 2014) tendo como principais espécies causadoras as espécies *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis*, porém outras espécies também foram registradas, tais como *Le. guyanensis*, *Le. lainsoni*, *Le. naiffi*, *Le. shawi* (Silveira et al., 1991; Gontijo & Carvalho, 2003; Rangel & Lainson, 2003; Lainson 2010, Thies et al., 2013). Em relação aos hospedeiros vertebrados de *Leishmania*, diversas espécies já foram encontradas infectadas no Brasil, como roedores, marsupiais, edentados, carnívoros, dentre outros, podendo participar como reservatórios silvestres e sinantrópicos do ciclo de transmissão da LTA (Guerra et al., 2006; Guerra et al., 2007; Marcelino et al., 2011; Quaresma et al., 2011; Freitas et al., 2012).

A ampla distribuição espacial da LTA tem atingido áreas não-endêmicas para a doença, apresentando um processo de expansão nos últimos anos (Brandão-Filho & Shaw, 1994; Brandão-Filho et al., 1999). O fato de haver diversas espécies de vetores nas regiões do Brasil e diferentes espécies de *Leishmania* agentes

etiológicos causadores da LTA faz com que a doença assuma um papel de dispersão sendo registrada em todos os estados brasileiros (Brasil, 2007).

A LV é considerada primariamente uma doença de caráter zoonótico, podendo acometer o homem quando este interfere no ciclo de transmissão. A doença assume importância do ponto de vista de saúde pública por ser potencialmente fatal para o homem, além de possuir ampla distribuição mundial (Gontijo & Melo, 2004; WHO, 2015).

A principal espécie causadora da LV nas Américas é a *Le. infantum*, que tem como principal vetor a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2005). Outras espécies de flebotomíneos também são apontadas como transmissoras em certas regiões do Brasil na ausência de *Lu. longipalpis*, como a espécie *Lu. cruzi* importante espécie associada a transmissão no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998) e *Mg. migonei* associada a transmissão em Pernambuco (Carvalho et al., 2010).

A LV tem registrado um crescimento do número de casos nos últimos anos, sendo registrados casos autóctones em todas as regiões do Brasil (Brasil, 2014). A doença mantém um caráter rural, mas ao longo dos anos foi se expandindo para grandes centros urbanos (Maia-Elkhoury et al., 2008; Brasil, 2014) e atualmente é considerada uma doença de caráter urbano devido às alterações do ambiente natural, como observado em vários municípios do país (Romero & Boelaert, 2010; Brasil, 2014). A região Sudeste, sobretudo o estado de Minas Gerais, é uma região endêmica para esta forma da doença, onde a presença do vetor *Lu. longipalpis*, juntamente com o cão, que é considerado como principal reservatório doméstico (Deane & Deane, 1962; França-Silva et al., 2003), geram condições propícias para a disseminação da LV no meio urbano.

1.2 Biologia e ecologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (Galati, 2003), popularmente conhecidos no Brasil como frebóti, cangalhinha, birigui, mosquito palha, entre outros nomes.

São insetos holometábolos, com desenvolvimento compreendido em ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto (Galati, 2003). Suas formas imaturas se desenvolvem no solo, local rico em matéria orgânica em decomposição, embora

pouco se saiba sobre os criadouros das larvas de flebotomíneos, uma vez que o encontro destas em criadouros naturais é raro. As larvas apresentam grande mobilidade deslocando-se à procura de alimento, o que pode ser um fator que dificulta o encontro destas no solo. Quando emergem de pupa para adulto, podem utilizar uma infinidade de ecótopos como abrigo.

As formas adultas aladas alimentam-se de sucos vegetais e soluções açucaradas (Pessoa & Barreto, 1948; Sherlock & Sherlock, 1972; Alexander & Usma, 1994), e utilizam o carboidrato presente nessas substâncias açucaradas como fonte de energia. Somente as fêmeas se alimentam de sangue, para maturação dos ovários.

Os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual, sendo as principais diferenças morfológicas observadas nos últimos segmentos abdominais modificados para constituir a genitália; modificações na probóscide, mais desenvolvida nas fêmeas para permitir sugar o sangue; e os dentes no cibário adaptados para iniciar a digestão sanguínea de forma mecânica (Brazil & Brazil, 2003). Costumam se abrigar em locais úmidos e sombreados até o momento em que necessitam realizar o repasto sanguíneo e cópula, momento em que podem invadir áreas antropizadas.

Acredita-se que alguns fatores como a temperatura, pluviosidade e umidade estão relacionados com a ocorrência de flebotomíneos em determinados locais (Chaniotis et al., 1971, Miscevic, 1981). Os flebotomíneos podem apresentar variação sazonal em alguns locais, onde fatores como alta umidade, chuvas em níveis moderados, temperatura e evaporação mais baixas podem favorecer o aumento da densidade de flebotomíneos no período chuvoso (Dias-Lima et al., 2003; Macedo et al., 2008). Assim, estudos sobre a variação sazonal dos flebotomíneos são importantes para compreender os hábitos dos vetores, além da importância epidemiológica que eles assumem, podendo inclusive direcionar ações para a redução da população e conseqüentemente auxiliar no controle das leishmanioses (Macedo et al., 2008).

Em todo o mundo, são conhecidas mais de 927 espécies de flebotomíneos, com maior abundância encontrada na região Neotropical totalizando cerca de 500 espécies. O Brasil é um país com grande diversidade de espécies de flebotomíneos, com aproximadamente 274 espécies registradas no território nacional (Shimabukuro et al., 2011; Andrade & Gurgel-Gonçalves, 2015).

O interesse em estudar os flebotomíneos se dá pela importância médica e veterinária que eles assumem, por serem transmissores de agentes etiológicos que

podem causar doenças ao homem e outros animais (Brazil et al., 2015). São conhecidos por serem vetores naturais de vários organismos que incluem vírus, bactérias e protozoários, dentre estes as *Leishmanias*, que causam as leishmanioses (Forattini, 1973; Miles et al., 1983; Shaw et al., 2003). Assim, com os estudos dos flebotomíneos é possível esclarecer aspectos relacionados à epidemiologia das leishmanioses.

Os flebotomíneos podem albergar parasitas de plantas e dos próprios insetos (Shaw et al., 2003), que apesar de não possuírem importância para saúde pública, podem ser detectados nos flebotomíneos uma vez que podem estar presentes no mesmo habitat em que eles se encontram.

Algumas espécies de flebotomíneos tem capacidade de adaptar-se à ambientes diferentes, incluindo ambientes urbanos e periurbanos. No Brasil, a espécie *Lu. longipalpis*, principal espécie vetora de *Le. infantum* (Deane 1956, 1962; Lainson & Shaw, 1979) é uma destas espécies com alto grau de sinantropia (Lainson & Rangel, 2005; Souza et al., 2004; Carvalho et al., 2010), encontrada em elevada densidade no peridomicílio das residências. Outras espécies de flebotomíneos tem importância na transmissão da *Le. braziliensis*, que causa a forma tegumentar da doença, como *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) na região Sudeste do Brasil (Mayrink et al., 1979; Andrade Filho et al., 2007). Essas duas espécies de flebotomíneos têm demonstrado considerável grau de sinantropia e adaptação ao ambiente urbano (Gontijo et al., 2002; Costa et al., 2007).

As características das populações de determinados insetos podem ser alteradas por fatores ambientais em determinada localidade. O processo de urbanização, por exemplo, causa alterações nos habitat naturais dos flebotomíneos o que conseqüentemente gera uma restrição nos ambientes ocupados por eles. Dessa forma, as espécies que possuem maior capacidade de adaptação resistem às diversas modificações e conseguem explorar novos ambientes, conseqüentemente aproximam-se cada vez mais do ambiente urbano (Forattini et al., 1976; Almeida et al., 2010). Assim, as alterações no ambiente natural são fatores importantes para a emergência e reemergência das leishmanioses.

A presença dos flebotomíneos no ambiente urbano é um fator preocupante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a transmissão da doença pode estar ocorrendo bem próximo às residências. Assim, conhecer os hábitos dos

flebotomíneos, bem como entender o papel destes na transmissão das leishmanioses é de grande importância para a saúde pública.

1.3 Estudos para detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Muitos estudos relacionados aos flebotomíneos tem se concentrado na pesquisa de infecção por *Leishmania*. Várias espécies de flebotomíneos são incriminadas como vetoras, embora a classificação de espécie vetora siga uma seleção de critérios sugeridos por Killick-Kendrick (1990), como ser antropofílico, a distribuição do vetor coincidir com a distribuição da doença no homem, o isolamento de *Leishmania* a partir de flebotomíneos capturados naquela área, flebotomíneos ser capaz de se infectar pela espécie de *Leishmania* e também ser capaz de transmitir a *Leishmania* entre mamíferos, dentre outros critérios.

A pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos inicialmente era realizada pelo método de dissecação do tubo digestório das fêmeas de flebotomíneos e visualização do conteúdo em microscópio. Porém, esta técnica apresenta algumas desvantagens, pois é uma técnica laboriosa, por depender de técnicos treinados e demandar maior tempo para a realização, além de não permitir a identificação precisa da espécie de *Leishmania*, uma vez que as fêmeas de flebotomíneos podem ser hospedeiras de espécies de outros flagelados como *Endotrypanum* e *Trypanosoma* que também apresentam forma flagelada no flebotomíneo, dificultando o diagnóstico (Shaw et al., 2003; Paiva et al., 2007).

Outra técnica que pode ser feita é a dissecação e isolamento do parasita em meio de cultura, embora também seja uma técnica em que o sucesso dependa da espécie do parasita e que a cultura esteja livre de contaminação por microorganismos, o que pode inviabilizar o estudo de *Leishmania* (Rodriguez et al., 1994; Tesh & Modi, 1984).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular tem gerado bons resultados na detecção e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos, por apresentar maior viabilidade, sensibilidade e especificidade nos resultados, sendo possível identificar a espécie de *Leishmania* em flebotomíneos infectados com variadas cargas parasitárias (Paiva et al. 2006, Saraiva et al. 2010, Neitzke-Abreu et al. 2014, Teles et al 2016).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Saiki et al., (1988) foi uma descoberta que revolucionou a biologia molecular, e tem sido atualmente uma das técnicas mais utilizadas para se detectar DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos (Guimarães et al., 2014; Rêgo et al., 2015; Saraiva et al., 2015; Teles et al., 2016; Azizi et al., 2016) . O método consiste em sintetizar *in vitro* milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima *taq* DNA polimerase. A reação é baseada em ciclos térmicos de desnaturação da fita de DNA, seguida do anelamento e da extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (os iniciadores) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo do que se deseja amplificar.

A técnica de PCR constitui uma ferramenta importante nos estudos de identificação de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos, além de determinar taxa de infecção natural nesses insetos, auxilia em estudos epidemiológicos quando bem padronizadas e aplicadas. No entanto, é preciso cautela quanto à interpretação dos resultados, uma vez que somente a detecção de DNA de *Leishmania* não é suficiente para se incriminar uma espécie como vetora.

As técnicas moleculares ainda possibilitam a utilização de diversos alvos para a detecção e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos, como regiões do kDNA dos parasitos, subunidade menor do RNA ribossomal (SSU), a região intergênica 1 (ITS 1), gene do mini-exon SL RNA, gene do *hsp70*, dentre outros (Harris et al., 1998; Dweik et al., 2007; Graça et al., 2012; Freitas-Lidani et al., 2014; Rêgo et al., 2015). Os diferentes alvos apresentam variações de sensibilidade e especificidade, sendo necessário o complemento com outras técnicas como PCR-RFLP e/ou reações de sequenciamento de DNA para a identificação mais precisa dos parasitos.

O desenho de iniciadores específicos para cada espécie, a amplificação das sequencias alvo, o sequenciamento genético e/ou digestão por enzimas de restrição possibilitam a identificação específica de *Leishmania*, por meio da visualização dos fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, tornando a biologia molecular como aliada em estudos de detecção de *Leishmania* em flebotomíneos.

Entretanto, existem algumas limitações das técnicas moleculares que podem depender de uma boa qualidade da amostra a ser testada (boa qualidade do DNA extraído, armazenamento adequado da amostra, quantidade de DNA disponível para realização de determinada técnica), além do risco de resultados falso-positivos ou contaminação por produtos previamente amplificados. Além disso, através da

técnica de biologia molecular não é possível o isolamento dos parasitas em cultura (Freitas-Lidani et al., 2014; Saraiva et al., 2010).

1.4 Estudo do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos

O estudo do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos é de grande significado ecológico e epidemiológico, pois pode fornecer informações importantes sobre os hábitos alimentares destes, além de contribuir para o conhecimento dos hospedeiros e fornecer informações importantes sobre os potenciais reservatórios em uma região (Haouas et al., 2007). O conhecimento sobre os hábitos alimentares possibilita ainda, descobrir o possível papel protetor e atrativo que certos animais desempenham em áreas endêmicas onde ocorram a transmissão de leishmaniose (Ferreira, 1945).

A determinação das fontes alimentares dos flebotomíneos é de grande interesse para as estratégias de controle para esses insetos, visto que o conhecimento sobre os hospedeiros os quais os flebotomíneos realizam repasto sanguíneo podem indicar a possível participação destes no ciclo de transmissão de *Leishmania* (Quaresma et al., 2012).

Existem alguns métodos descritos para a identificação de sangue ingerido por insetos hematófagos, como os ensaios imunológicos, no qual o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o método mais tradicional adaptado para identificação de conteúdo sanguíneo em insetos (Edrissian & Hafizi, 1982). Os ensaios imunológicos vem sendo aperfeiçoados ao longo dos anos, para melhor uso da técnica na tentativa de identificação do sangue ingerido obtendo resultados satisfatórios (Blackwell et al., 1995; Gomes et al., 2001). Entretanto, as técnicas imunológicas apresentam limitações quanto ao seu uso, pois necessitam da produção de anticorpos específicos para as potenciais fontes sanguíneas, não indicando outros hospedeiros inesperados, além de poder apresentar reações cruzadas (Chow et al., 1993; Haouas et al., 2007).

Atualmente, as técnicas moleculares tem sido utilizadas para a identificação de sangue ingerido por insetos, incluindo os flebotomíneos (Michael et al., 2001; Kent & Norris, 2005; Bosseno et al., 2006, Pizarro et al., 2007; Sant'Anna et al., 2008; Valinsky et al., 2014), na tentativa de se alcançar um resultado mais preciso. A PCR tem sido utilizada para a identificação de sangue ingerido por flebotomíneos, uma

vez que estes ingerem pouquíssima quantidade de sangue, sendo assim, a técnica da PCR tem mostrado bons resultados para este fim (Steuber et al., 2005; Quaresma et al., 2012; Valinsky et al., 2014, Sales et al., 2015).

Os marcadores de genes mitocondriais tem sido alguns dos alvos da PCR mais utilizados para a identificação do sangue ingerido por insetos (Coulson et al., 1990; Kent & Norris et al., 2005; Molaei et al., 2008). O gene mitocondrial do citocromo b (*Cyt b*) tem obtido resultados satisfatórios na pesquisa, pois apresenta vantagens por ser uma região do genoma mitocondrial muito conservada que não sofre recombinação, além de possuir sequências de DNA completas de vertebrados no banco de dados (Genbank) (Perkins & Schall, 2002). Além disso, outra vantagem é a existência de iniciadores desenhados para o gene do citocromo b, que são capazes de amplificar o gene de vertebrados de diversas espécies (Irwin et al., 1991; Steuber et al., 2005).

Assim, a técnica de PCR aliada ao sequenciamento de DNA tem auxiliado na identificação das fontes alimentares dos flebotomíneos, o que pode contribuir para a compreensão do ciclo de transmissão das leishmanioses e também auxiliar no controle dos flebotomíneos.

2 JUSTIFICATIVA

A região metropolitana de Belo Horizonte é uma área endêmica para leishmanioses no estado de Minas Gerais (Passos et al., 2001; Luz et al., 2001; Carvalho et al., 2010). O município de Brumadinho faz parte desta região metropolitana e tem apresentado uma expansão do número de casos autóctones de LTA e LV humana nos últimos anos. No período de 2007 a 2015 foram confirmados 28 casos de LTA no município, sendo três casos notificados na localidade de Casa Branca. No mesmo período, 13 casos de LV foram confirmados com 4 casos pertencentes à Casa Branca (SMS – Brumadinho-MG, 2016). Casa Branca foi a localidade que mais contribuiu com o número de casos de leishmanioses para o município de Brumadinho.

Além dos casos humanos, Brumadinho apresenta casos de LV canina. Em um estudo recente conduzido no município para avaliar a prevalência da LV canina, foram avaliados 1.413 cães, apresentando 60 cães sororreagentes para *Le. infantum*, obtendo uma taxa de prevalência canina de 4,25% (Pereira, 2016). Apesar da baixa porcentagem de cães sororreagentes neste estudo em Brumadinho, esses dados merecem atenção uma vez que é sabido que o cão tem seu papel comprovado como principal reservatório urbano, e tem sido associado à ocorrência da doença humana em meio urbano (Monteiro et al., 2005; Teixeira-Neto et al., 2014). Somado a isso, em outro estudo realizado em Casa Branca, Pereira (2015) detectou pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos infectados naturalmente por *Le. braziliensis* e *Le. infantum*, mostrando a presença de outros possíveis reservatórios na localidade. Esses dados evidenciam a presença de espécies de *Leishmania* circulando entre os reservatórios, porém ainda há uma lacuna a ser preenchida em relação aos estudos dos flebotomíneos nesta área.

A região onde Casa Branca está inserida é margeada pela unidade de conservação Parque Estadual Serra do Rola Moça, o terceiro maior parque em área urbana do Brasil (IEF, 2016), apresentando abundância de recursos naturais, grande diversidade de fauna e flora nesta região. A proximidade do distrito de Casa Branca com o ambiente de mata pode proporcionar um fluxo de espécies entre estes ambientes, sobretudo espécies de interesse e importância médica como os flebotomíneos.

Somado a isso, a localidade de Casa Branca está em constante processo de modificação do ambiente natural sendo uma localidade em urbanização. Casa Branca é uma região bastante visada por quem busca qualidade de vida e contato com a natureza. A modificação do ambiente provavelmente poderia estar contribuindo de forma significativa para o surgimento de casos autóctones humanos e caninos de leishmanioses na localidade de Casa Branca, o que conseqüentemente contribui para o aumento do número de casos no município de Brumadinho. Assim, a modificação do ambiente natural associado à grande capacidade de adaptação dos flebotomíneos ao meio antrópico (AndradeFilho et al., 2001) poderia estar relacionada ao aumento do número de casos de leishmanioses em Casa Branca.

Como já mencionado, pouco se sabe sobre a transmissão das leishmanioses neste local, uma vez que não existem estudos sobre a fauna de flebotomíneos em Casa Branca, sendo assim, a transmissão das leishmanioses ainda não foi elucidada na localidade. Além disso, é de fundamental importância a identificação das espécies vetoras e das espécies de *Leishmania* que circulam entre os diferentes hospedeiros na localidade para compreensão o ciclo da doença.

Diante desta situação, faz-se necessária a execução de estudos sobre os flebotomíneos a fim de se conhecer a fauna flebotomínica local e os aspectos relacionados à transmissão das leishmanioses no distrito de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, para que se possa auxiliar no direcionamento das medidas de prevenção e controle das leishmanioses.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a fauna de flebotomíneos envolvida na epidemiologia das leishmanioses na localidade de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a fauna de flebotomíneos na localidade Casa Branca.
- Estudar a variação sazonal das espécies de flebotomíneos na localidade.
- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos da localidade.
- Identificar as espécies de *Leishmania* detectadas nos flebotomíneos.
- Determinar as fontes alimentares das fêmeas de flebotomíneos com sinais de repasto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Brumadinho (20° 08' 36" S e 44° 11' 59" W) está localizado na região Metropolitana de Belo Horizonte a 49 km de distância da capital mineira, abrangendo uma área de 639,434 km² com população total de 37.857 habitantes (IBGE, 2015). O município encontra-se na zona de clima Tropical Brasil Central, caracterizado como clima quente, com temperatura média acima de 18°C em todos os meses, semi-úmido, com 4 a 5 meses secos e altos índices pluviométricos. Está inserido em uma área que integra o denominado Quadrilátero Ferrífero, rica em campos ferruginosos.

O estudo foi realizado no distrito de Casa Branca (20° 6'2.58"S e 44° 2'59.45" W), localizado na porção norte do município de Brumadinho (Figura 1). A região onde Casa Branca está inserida é margeada pela unidade de conservação Parque Estadual Serra do Rola Moça, uma unidade de conservação gerenciada pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF, 2016)(Figura 2), sendo o terceiro maior parque em área urbana do Brasil, situado numa zona de transição de Cerrado para Mata Atlântica. Situada a 930 metros de altitude, Casa Branca é uma localidade bastante visitada que atrai o turismo para essa região por apresentar belas paisagens e recursos naturais em abundância, sendo um local bastante procurado para moradia em condomínios residenciais, prática de atividades de ecoturismo e gastronomia, além de estar localizada próxima à capital Belo Horizonte.

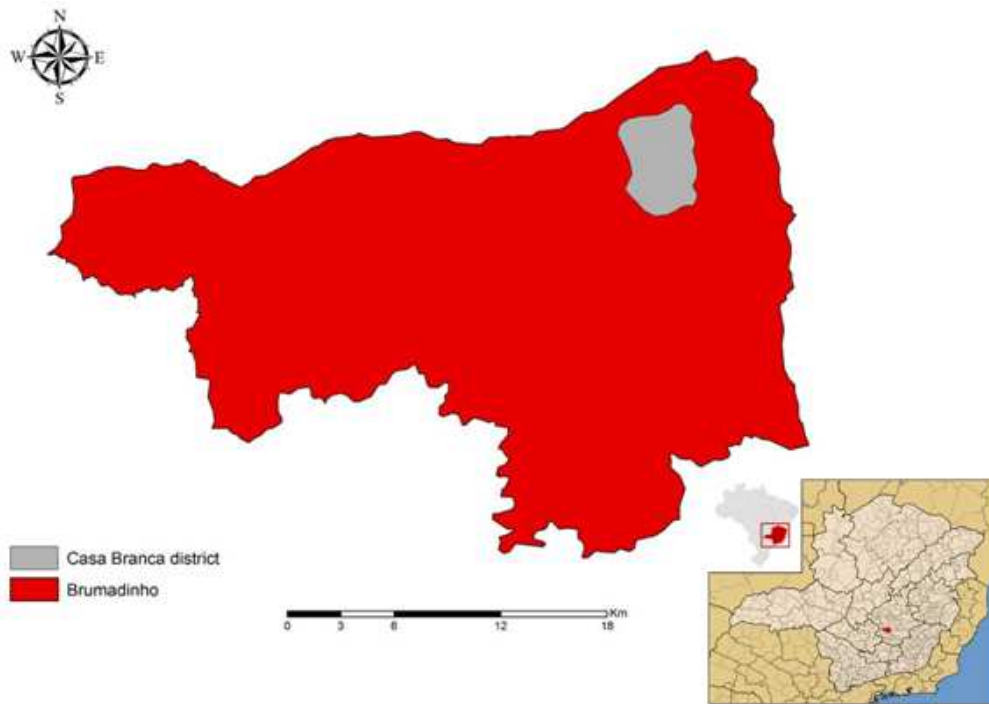


Figura 1. Localização do distrito de Casa Branca, no município de Brumadinho, Minas Gerais.



Figura 2. Imagem da localização do distrito de Casa Branca em relação aos municípios vizinhos e o Parque Estadual Serra do Rola Moça, no estado de Minas Gerais (Fonte: Google Maps, 2016).

4.2 Estudo da fauna de flebotomíneos

4.2.1 Coletas de flebotomíneos

As coletas de flebotomíneos foram realizadas bimensalmente, entre maio de 2013 e julho de 2014. Foram utilizadas duas armadilhas luminosas tipo CDC, modelo HP (Pugedo et al., 2005) expostas no peridomicílio de nove residências, colocadas às 8:00 horas da manhã e recolhidas às 16:00 horas do dia seguinte, durante três noites consecutivas de cada mês, totalizando 18 armadilhas. Os locais de coleta foram selecionados por apresentarem registros de casos humanos/caninos de leishmaniose, distribuídos ao longo de todo o distrito (Figura 3). Além disso, os locais de coleta possuíam criação de animais próximos às residências e presença de árvores frutíferas (Figura 4).

O quadro 1 apresenta a descrição do ambiente peridomiciliar das nove casas escolhidas para coleta de flebotomíneos, residências que foram selecionadas por apresentar casos de leishmaniose humana ou canina.

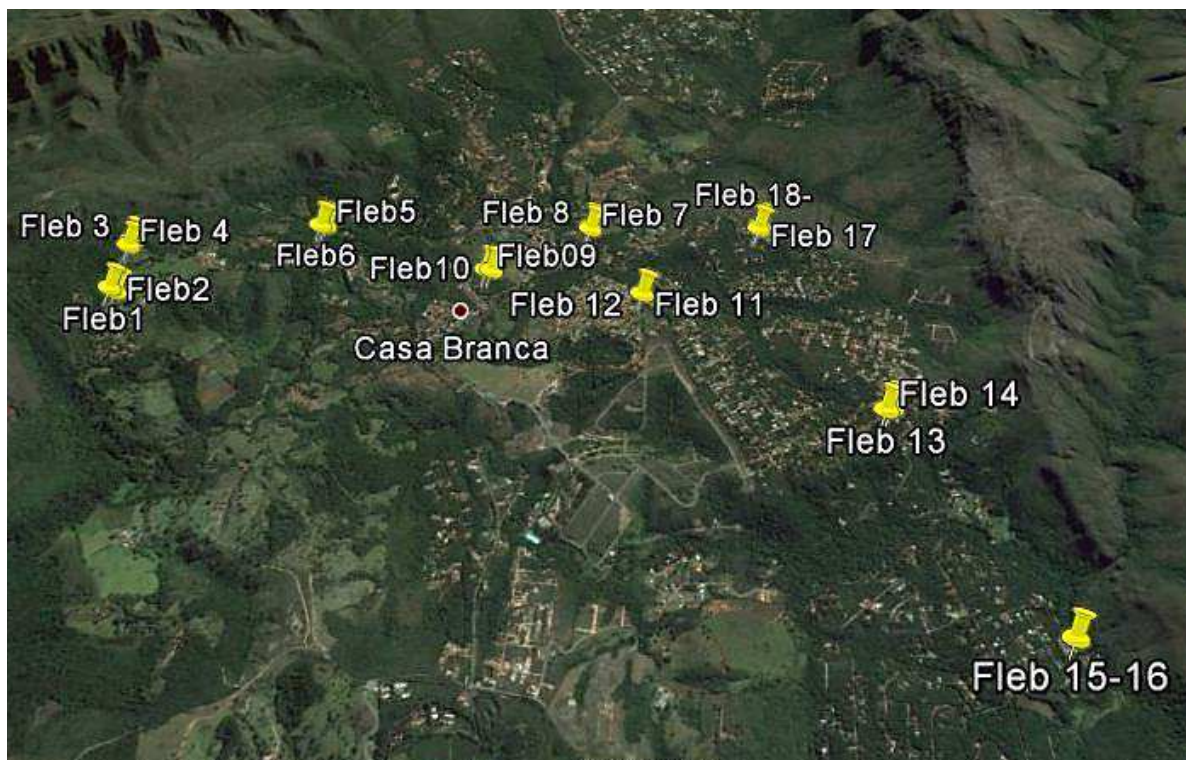


Figura 3. Distribuição dos pontos de coleta de flebotomíneos no distrito de Casa Branca, município de Brumadinho, Minas Gerais (Fonte: Google Earth, 2016).



Figura 4. Peridomicílio de algumas residências escolhidas para exposição das armadilhas para coleta de flebotomíneos em Casa Branca, Brumadinho durante o período de maio de 2013 a julho de 2014.

QUADRO 1. Descrição do peridomicílio das residências selecionadas para coleta de flebotômíneos em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.

Casa/Pontos de coleta	Descrição do ambiente	Casos de leishmaniose
Casa 1 – Fleb 1 e 2	Residência com criação de animais (galinha, pato e cão). Presença de árvores frutíferas, com um córrego ao fundo. Foram capturados roedores e marsupiais (coleta de pequenos mamíferos em outro trabalho).	LV canina
Casa 2 – Fleb 3 e 4	Presença de mata mais afastada da casa. Criação de animais (galinha, pato, cães) e presença de árvores frutíferas. Foram capturados roedores (coleta de pequenos mamíferos).	LV canina
Casa 3 – Fleb 5 e 6	Residência com criação de galinhas. Apresentava quintal com árvores frutíferas, local sombreado, presença de jardim e um córrego ao lado do quintal.	LV canina
Casa 4 – Fleb 7 e 8	Residência com criação de cão, plantações de pequenas hortaliças. Foram capturados roedores e marsupiais (coleta de pequenos mamíferos).	LV canina
Casa 5 – Fleb 9 e 10	Residência mais próxima ao centro de Casa Branca, apresentando galinheiro, chiqueiro e cão. Presença de poucas árvores.	LV canina
Casa 6 – Fleb 11 e 12	Residência com presença de árvores e muito mato, um pequeno esgoto correndo a céu aberto. Criação de galinhas e cão. Foram capturados roedores (coleta de pequenos mamíferos).	LTA humana
Casa 7 – Fleb 13 e 14	Residência localizada em um condomínio. Presença de árvores frutíferas e plantas rasteiras. Criação de galinhas e cão.	LV canina
Casa 8 – Fleb 15 e 16	Residência localizada em um condomínio. Presença de galinheiro ao lado da casa, cães e árvores frutíferas. Mata localizada próxima aos fundos da casa.	LV humana
Casa 9 – Fleb 17 e 18	Residência localizada em um condomínio, próxima à mata, com mato e árvores frutíferas, e criação de cão. Foram capturados marsupiais (coleta de pequenos mamíferos).	LV humana

4.2.2 Processamento do material coletado

As armadilhas eram retiradas e os sacos coletores colocados em câmara de éter por 20 minutos para sacrifício dos flebotomíneos. Em seguida, foi realizada a triagem e sexagem dos flebotomíneos. Os machos foram acondicionados em tubos contendo álcool 70% e armazenados a temperatura ambiente para posterior preparação, montagem e identificação.

As fêmeas foram retiradas com agulha de insulina estéril e colocadas em criotubo de 1,5 mL contendo solução de DMSO 6% (dimetilsulfóxido) que tem ação de preservação das células evitando a morte celular. Foram mantidas no freezer sob temperatura de -20°C, até o momento de dissecação, montagem, identificação e posterior realização das técnicas de extração de DNA e biologia molecular.

4.2.3 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos

Os machos foram submetidos à técnica de Preparação de Flebotomíneos, onde foram transferidos para uma placa de Petri contendo KOH 10% por 3 horas. Em seguida foram transferidos para outra placa contendo HAc 10% por 15 minutos e posteriormente foram lavados em Água do Tipo I por 15 minutos em três séries. Na última etapa foram colocados em uma placa contendo Lactofenol onde permaneceram por 24 horas. Após este processo os machos foram montados entre lâmina e lamínula utilizando o líquido de Berlese (Langeron 1949, modificada). A utilização do Berlese para montagem de machos foi adotada por permitir melhor visualização das estruturas no microscópio, sendo mais fácil o manuseio do flebotomíneo em líquido de Berlese no momento da montagem por apresentar menor viscosidade e conseqüentemente menor perda de caracteres devido à manipulação.

As fêmeas provenientes das coletas de maio/2013, setembro/2013, janeiro/2014 e maio/2014 foram dissecadas retirando-se os três últimos segmentos do abdômen e cabeça, montadas entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese, que permite melhor visualização das estruturas internas devido a menor refringência. O restante do corpo foi acondicionado individualmente em tubo de 1,5 mL estéreis para posterior montagem dos pools para extração de DNA. As fêmeas das coletas

julho/2013, novembro/2013, março/2014 e julho/2014 foram montadas em Berlese para identificação da espécie, não sendo destinadas à biologia molecular.

A identificação foi realizada utilizando microscópio ótico observando os caracteres morfológicos internos e externos, seguindo a classificação proposta por Galati (2003).

4.3 Dados climáticos

Os dados climáticos de temperatura média (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm³) referentes ao período de estudo foram obtidos junto à Estação Meteorológica Automática Ibirité localizada no Parque Estadual Serra do Rola Moça (INMET, 2015). Esta estação meteorológica encontra-se à distância aproximada de 10 km da localidade de Casa Branca.

4.4 Avaliação ecológica e análise dos dados

Para avaliar as espécies mais abundantes na área de estudo foi utilizado o Índice de abundância das espécies “ISA”, e em seguida foi utilizado o Índice padronizado de abundância das espécies “SISA” (Roberts & Hsi, 1979). Neste índice, os valores se distribuem em uma escala de 0 a 1, e resultados com valores mais próximos a 1 correspondem às espécies mais abundantes coletadas na área de estudo.

Os índices de Shannon (H) e de Pielou (J) (Hayek & Buzas, 1997) foram utilizados para medir a diversidade das espécies em toda a área de estudo e a uniformidade da abundância das espécies em Casa Branca.

Para avaliar a quantidade de flebotomíneos capturados e a correlação destes com as variáveis climáticas da localidade Casa Branca no período de estudo foi utilizado o teste de Correlação de Spearman.

4.5 Detecção de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

4.5.1 Extração de DNA das fêmeas não alimentadas

As fêmeas que não apresentavam sangue em seu abdômen após serem dissecadas e identificadas foram colocadas a seco individualmente em tubo de 1,5 mL ou agrupadas em pools de até 20 indivíduos da mesma espécie, data e local de coleta.

As fêmeas foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit GenraPuregene (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. As fêmeas foram maceradas e colocados 100 µL de solução de lise celular (para uma fêmea) ou 400 µL (para pool de 20 fêmeas) em cada tubo. Em seguida foi adicionado 1 µL de proteinase K (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para pool de 20 fêmeas) e misturadas por inversão, incubadas a 55°C overnight. Em seguida foi adicionado 1 µL de RNase solução (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para pool de 20 fêmeas) e novamente misturado por inversão. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e em seguida, incubadas por 3 minutos no gelo ou no freezer. Foi adicionado 100 µL de precipitação de proteínas (para uma fêmea) ou 200 µL de precipitação de proteínas, passado no vortex e na centrífuga por 10 minutos para formação do pellet. O líquido foi vertido em um novo tubo e novamente foi repetido o passo de adicionar 200 µL de precipitação de proteínas neste novo tubo, colocado em vortex e centrifugar, e foi vertido o líquido em um novo tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 rpm onde ocorreu a formação do pellet. Foi colocado 300 µL de isopropanol em um tubo limpo de 1,5 mL e adicionado o sobrenadante do passo anterior vertendo cuidadosamente. Misturou por inversão 50 vezes e em seguida centrifugou por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, para secagem do tubo que foi invertido contra um papel absorvente. Em seguida foi adicionado 300 µL de etanol 70% e invertido várias vezes para lavar o pellet de DNA. Na próxima etapa foi adicionado 30 µL de acetato de sódio 10% e levado ao freezer por 1 hora. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e descartado o sobrenadante. Para a etapa de secagem o tubo foi invertido contra um papel absorvente, permitindo que o DNA seque até não sobrar nenhum volume de álcool no tubo. Para a etapa final, foi adicionado 15 µL de solução de hidratação de DNA ou água DNase (para uma fêmea) ou 40 µL (para pool de 20 fêmeas) e as amostras foram incubadas à 65°C por 1 hora. Ao final, as amostras foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente e depois armazenadas no freezer.

4.5.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer (ITS1)

Após a extração de DNA, foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase dirigida ao internal transcribed spacer 1 (ITS1) do DNA ribossomal de *Leishmania* para determinar a detecção de DNA de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos coletados no peridomicílio de Casa Branca. A técnica dirigida ao alvo ITS1 amplifica uma região de 300 pb a 350 pb, utilizando os iniciadores LITSR: 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' (El Tai et al., 2000, Schonian et al., 2003). A reação foi preparada para um volume final de 25 µL contendo 5 µL de DNA da amostra, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL do iniciador LITSR a 10µM, 1,25 µL do iniciador L5.8S a 10µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 10U/ µL, e 13 µL de H₂O destilada estéril. Após a preparação das amostras, a reação foi processada em termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Em todas as reações de PCR foram incluídos controle negativo utilizando água destilada estéril como "template" e o DNA extraído dos controles positivos cepas referência: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). Como flebotomíneos podem albergar outros parasitos, foram adicionados controles exógenos em algumas reações de PCR, sendo eles: *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048), *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151), *Herpetomonas samuelpessoai* (COLPROT 067), *Leptomonas collosoma* (COLPROT 073) e *Phytomonas serpens* (COLPROT 189). Estes controles foram gentilmente cedidos pela Coleção de Protozoários do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil).

A técnica de eletroforese em gel foi utilizada para visualização dos produtos amplificados provenientes da PCR, em exposição a luz ultravioleta. Utilizamos o gel de agarose na concentração de 2% corado com brometo de etídio (10mg/mL) e peso molecular de tamanho padrão 100 pb (DNA Step Ladder). As amostras consideradas positivas apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado de 300-350 pb para *Leishmania*. Produtos amplificados de tamanho incompatível com o

esperado também foram considerados positivos, porém necessitando de maior investigação para se identificar do que se tratava.

Os produtos amplificados dos pools positivos na PCR-ITS1 foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de digestão *Hae* III como descrito por Schonian et al. (2003). Esta reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL da enzima *Hae* III (10U/mL), 1,5 µL de tampão da enzima, 2,5 µL de H₂O destilada e 10,0 µL de produto de PCR. Em seguida foi incubada a 37°C por 2 horas e o resultado obtido nos perfis de restrição foram analisados em gel de agarose com concentração 4% e comparado com o padrão do produto da PCR-RFLP dos controles positivos das cepas referência de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos (já indicados neste tópico).

A técnica de PCR-RFLP torna possível a distinção entre algumas espécies de *Leishmania*, como: *Le. donovani*, *Le. infantum*, *Le. aethiopica*, *Le. tropica*, *Le. major*, *Le. mexicana*, *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis* e *Le. panamensis*. Em relação a outras espécies de tripanossomatídeos não-*Leishmania*, pouco se sabe sobre a identificação destas espécies em flebotomíneos, sobretudo associadas à utilização da técnica de PCR-RFLP associado ao alvo ITS1.

4.5.3 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado como método confirmatório neste estudo para todas as amostras de produtos amplificados considerados positivos na PCR convencional. Para isso, as amostras que apresentavam perfil semelhante ao desejado e as que amplificaram fragmentos diferentes do esperado foram cortadas do gel de agarose, foi feita a purificação do produto da PCR utilizando o Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) como descrito pelo fabricante. Após a purificação das amostras, o produto foi preparado para o sequenciamento no qual cada amostra foi feita em duplicata, preparando um “mix” contendo 1 µL do produto purificado, 1 µL de primer a concentração de 5 pmol (antisense e sense em tubos separados), 1 µL Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e água destilada para um volume final de 10 µL. As sequências foram determinadas pelo sequenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer, empregando o programa que alterna 35 ciclos de 95° C por 15 segundos e 65°C por 15 segundos. As análises das sequências foram feitas nos softwares Seqtrace (Stuky, 2012) e MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). O resultado das análises foi comparado com as sequências depositadas no banco de dados

GenBank através do algoritmo de alinhamento BLAST, considerando os dois organismos mais semelhantes de acordo com a identidade acima de 80%.

4.5.4 Construção da árvore Neighbor-joining

Com o intuito de mostrar a semelhança entre as sequências dos parasitos encontrados neste estudo com as cepas padrão de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, foi realizada a construção da árvore Neighbor-joining utilizando o programa MEGA 7.0 (MEGA, PA, USA) e o método de filogenia Bootstrap.

Para edição das árvores geradas a partir do programa MEGA 7.0 foi utilizado o software Figtree v1.4.3.

4.6 Detecção da fonte alimentar das fêmeas com sinais de repasto

4.6.1 Extração de DNA das fêmeas alimentadas

As fêmeas que apresentavam traços de sangue em seu abdômen foram dissecadas retirando-se a cabeça e a terminália (três últimos segmentos abdominais), montadas entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese e identificadas de acordo com classificação de Galati (2003). O restante do corpo foi colocado a seco em tubo de 1,5 mL estéril para realização de extração de DNA que consistiu em macerar individualmente usando pistilo estéril em 50 µL de água Milli-Q autoclavada. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por agitação em vórtex durante 15 segundos, centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 segundos para extração de DNA utilizando o kit GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. A fim de controlar potenciais contaminações das amostras, realizamos a descontaminação dos instrumentos e áreas de trabalho com solução de hipoclorito de sódio a 2%. Como controle interno em todas as extrações de DNA foram utilizados flebotomíneos machos (*Lu. Longipalpis*).

4.6.2 PCR dirigida ao gene do Citocromo b de vertebrados (*Cyt b*)

A reação de PCR foi realizada com base na amplificação de um fragmento de 359 pb do gene do citocromo b (*Cyt b*) dos vertebrados com os iniciadores *cyt1*: 5' CCATCAAACATCTCAGCATGAAA 3' e *cyt2*: 5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC 3' seguindo o protocolo inicialmente descrito por Steuber et al. (2005). Para a reação

de amplificação foi preparada uma mistura contendo 1x buffer com 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 10mM de iniciadores forward e reverse, 1U/μL *Taq* Platinum[®] DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 μL de DNA template em um volume final para 25 μL.

Para controle positivo da reação de PCR foi incluído DNA extraído de uma amostra de sangue de cão (*Canis familiaris*) e para controle negativo interno foi utilizado DNA extraído de flebotomíneos machos. Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10mg/mL) e peso molecular de 100pb DNA Step Ladder. As amostras que apresentavam perfis semelhantes ao desejado (359 pb) foram cortadas do gel de agarose e purificadas utilizando o kit de Extração de bandas de Gel QIAquick (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram determinados pelo sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) como descrito no item 4.5.3 desta sessão. Utilizamos o software FinchTV (Geospiza, Inc.) para verificar manualmente os eletroferogramas e o software SeqTrace (Stucky 2012) foi usado para alinhar e calcular a seqüência consenso de regiões de similaridade entre as seqüências de banco de dados GenBank através da ferramenta de alinhamento BLAST. A identificação a nível específico foi considerada quando as seqüências apresentaram mais de 95% de identidade cobrindo pelo menos 95% da seqüência analisada.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo da fauna de flebotomíneos

No período de coleta de maio de 2013 a julho de 2014 foram capturados 16.771 flebotomíneos em Casa Branca, pertencentes a oito gêneros distribuídos em 23 espécies: *Brumptomyia* sp., *Evandromyia cortelezii* (Brèthes, 1923), *Ev. edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Ev. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936), *Ev. lenti* (Mangabeira, 1938), *Ev. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939), *Ev. teratodes* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Ev. termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Ev. tupynambai* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia amarali* (Barretto & Coutinho 1940), *Lu. ischyraantha* (Martins, Falcão & Silva, 1962), *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Ny. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Pintomyia bianchigalatae* (Andrade-Filho, Aguiar Dias & Falcão, 1999), *Pi. fischeri* (Pinto, 1926), *Pi. mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias & Brazil 1994), *Pi. misionensis* (Castro, 1959), *Pi. monticola* (Costa Lima, 1932), *Pi. pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psathyromyia pascalei* (Coutinho & Barretto, 1940) e *Psychodopygus lloydi* (Antunes, 1937). Em alguns indivíduos não foi possível a identificação a nível específico devido à perda de caracteres morfológicos essenciais para a identificação, portanto, alguns exemplares foram identificados somente o gênero (Tabela 1).

TABELA 1. Flebotomíneos capturados no peridomicílio das residências do distrito de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais no período de maio 2013 a julho de 2014.

Espécies	Flebotomíneos capturados			
	♂	♀	Total	%
<i>Brumptomyia</i> sp.	4	7	11	0,1
<i>Complexo cortelezzii</i>	0	38	38	0,2
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	10	0	10	0,1
<i>Evandromyia edwardsi</i>	0	1	1	0
<i>Evandromyia evandroi</i>	1	0	1	0
<i>Evandromyia lenti</i>	54	43	97	0,6
<i>Evandromyia sallesi</i>	5	0	5	0
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	1	1	0
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	11	11	0,1
<i>Evandromyia tupynambai</i>	4	15	19	0,1
<i>Lutzomyia amarali</i>	0	3	3	0
<i>Lutzomyia ischyracantha</i>	1	0	1	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2075	476	2551	15,2
<i>Migonemyia migonei</i>	1213	320	1533	9,1
<i>Nyssomyia intermedia</i>	2	2	4	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	6645	5238	11883	70,9
<i>Pintomyia bianchigalatiae</i>	1	75	76	0,5
<i>Pintomyia fischeri</i>	111	146	257	1,5
<i>Pintomyia mamedei</i>	0	1	1	0
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	9	9	0,1
<i>Pintomyia monticola</i>	6	35	41	0,2
<i>Pintomyia pessoai</i>	7	41	48	0,3
<i>Pintomyia</i> sp.	0	23	23	0,1
<i>Psathyromyia pascalei</i>	3	1	4	0
<i>Psathyromyia</i> sp.	0	1	1	0
<i>Psychodopygus lloydi</i>	17	125	142	0,9
Total	10159	6612	16771	100
%	60,6%	39,4%	100%	

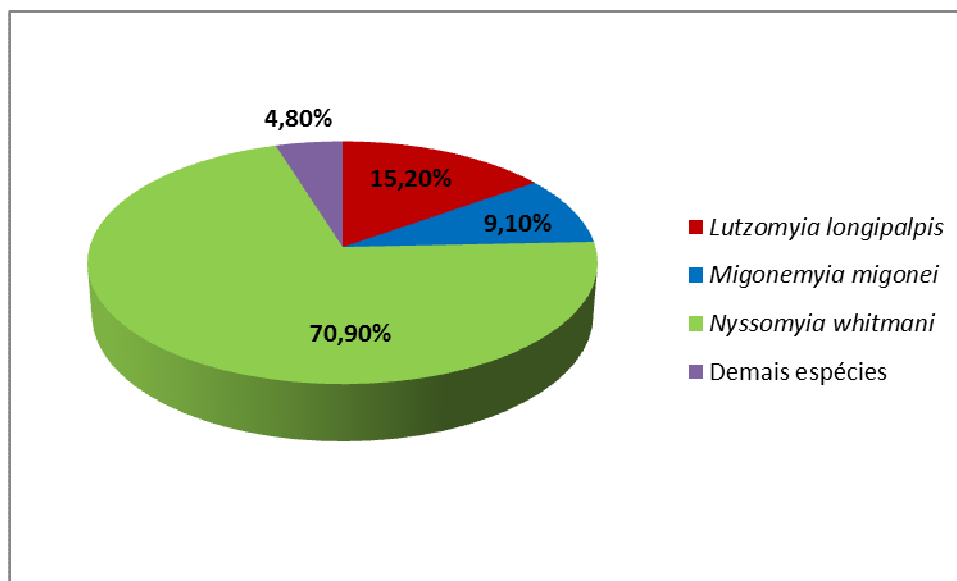


Figura 5. Porcentagem das espécies de flebotomíneos capturadas no peridomicílio no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.

A espécie com maior número de indivíduos coletados foi *Ny. whitmani* (70,9%), seguida pela espécie *Lu. longipalpis* (15,2%) e *Mg. migonei* (9,1%). As demais espécies somaram 4,8% dos flebotomíneos coletados (Figura 5). A quantidade de machos capturados (60,6%) foi maior que a de fêmeas (39,4%) nesse estudo (Tabela 1).

Em relação aos oito gêneros capturados, o gênero *Evandromyia* compreendeu o maior número de espécies dentre as 23 encontradas, totalizando oito espécies mais o complexo *cortelezzii*. Em seguida o gênero que compreendeu segundo maior número de espécies foi *Pintomyia* representado por seis espécies capturadas (Tabela 1).

A Tabela 2 traz informações a cerca das espécies capturadas de acordo com os meses de coleta em Casa Branca.

TABELA 2. Distribuição mensal de flebotomíneos no peridomicílio das residências de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.

	mai/13		jul/13		set/13		nov/13		jan/14		mar/14		mai/14		jul/14		Total		Total (%)
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	7	11 (0.1)
Complexo <i>cortelezzii</i>	0	7	0	2	0	12	0	5	0	1	0	1	0	9	0	1	0	38	38 (0.2)
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	1	0	2	0	3	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	10	0	10 (0.1)
<i>Evandromyia edwardsi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.0)
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.0)
<i>Evandromyia lenti</i>	1	0	0	1	2	2	10	5	39	29	0	2	2	3	0	1	54	43	97 (0.6)
<i>Evandromyia sallesi</i>	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	5	0	5 (0.0)
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.0)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	1	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0	0	11	11 (0.1)
<i>Evandromyia tupynambai</i>	0	1	0	0	3	0	0	2	0	2	0	0	1	10	0	0	4	15	19 (0.1)
<i>Lutzomyia amarali</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	3	3 (0.0)
<i>Lutzomyia ischyraantha</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.0)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	528	127	57	5	430	112	181	41	63	22	214	62	547	104	55	3	2075	476	2551 (15.2)
<i>Migonemyia migonei</i>	219	90	72	12	175	53	156	49	104	17	73	24	373	62	41	13	1213	320	1533 (9.1)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4 (0.0)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	3449	2535	79	263	793	680	547	343	625	324	101	72	974	959	77	62	6645	5238	11883 (70.9)
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	0	13	0	0	0	10	1	2	0	3	0	17	0	30	0	0	1	75	76 (0.5)
<i>Pintomyia fischeri</i>	7	13	6	2	7	11	34	15	27	34	14	18	11	49	5	4	111	146	257 (1.5)
<i>Pintomyia mamedei</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.0)
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	1	0	9	9 (0.1)
<i>Pintomyia monticola</i>	1	4	0	2	0	1	2	0	0	1	0	6	2	21	1	0	6	35	41 (0.2)
<i>Pintomyia pessoai</i>	1	1	0	0	1	18	0	19	3	0	1	0	1	3	0	0	7	41	48 (0.3)
<i>Pintomyia</i> sp.	0	19	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23 (0.1)
<i>Psathyromyia pascalei</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	3	1	4 (0.0)
<i>Psathyromyia</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.0)
<i>Psychodopygus lloydi</i>	1	33	0	4	0	0	6	3	4	47	0	0	6	38	0	0	17	125	142 (0.9)
Total (%)	4209	2845	217	299	1423	908	938	489	868	482	404	206	1919	1298	181	85	10159	6612	16771 (100)
	7054(42)		516(3,1)		2331(13,9)		1427(8,6)		1350(8)		610(3,6)		3217(19,2)		266(1,6)		16771 (100)		

O mês de maio de 2013 apresentou a maior abundância de espécies coletadas com 7.054 flebotomíneos, o que correspondeu a 42% do total de flebotomíneos capturados em toda coleta. O segundo mês de maior número de indivíduos capturados foi o mês de maio de 2014 totalizando 3217 (19,2%). Já o mês de menor número de flebotomíneos capturados foi o último mês de coleta, julho de 2014, que apresentou 266 (1,6%) indivíduos capturados (Tabela 2).

As espécies mais frequentes em toda coleta foram espécies de importância médica incriminadas como vetoras de *Leishmania* no Brasil: *Ny. whitmani*, *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei*. A espécie mais abundante durante todos os meses de coleta foi *Ny. whitmani*, com exceção do mês de março/2014 onde a espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* (Figura 6).

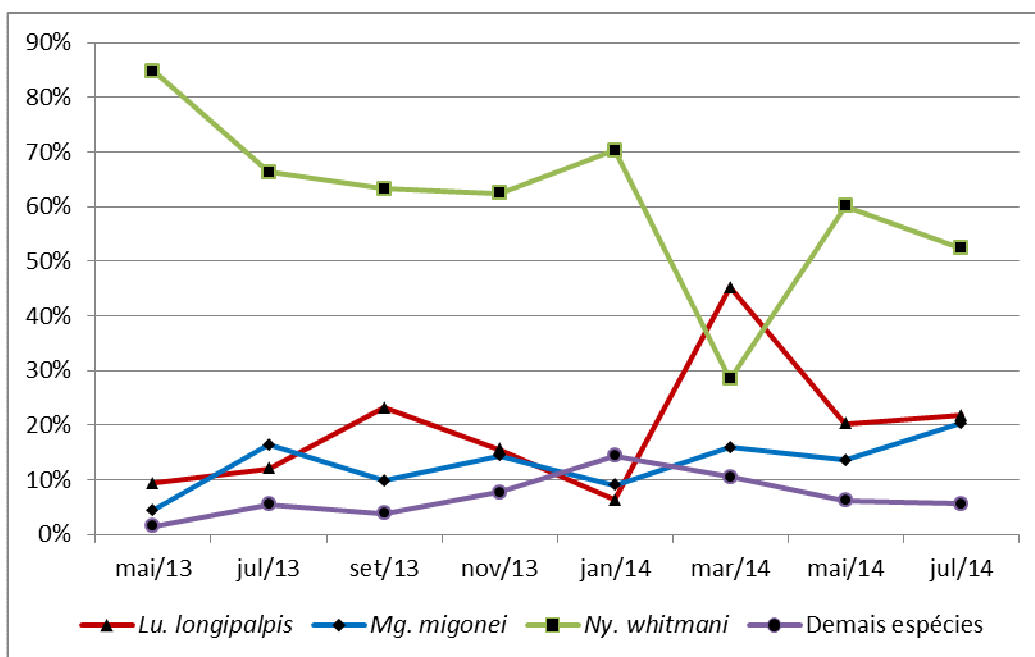


Figura 6. Distribuição mensal das espécies vetoras e demais espécies de flebotomíneos capturadas durante os meses de coleta no peridomicílio das residências de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.

Os índices de Shannon (H) e de Pielou (J) foram calculados para todo o período de coleta. A diversidade das espécies medida pelo índice de Shannon e uniformidade da abundância das espécies nos locais de coleta (Pielou) mostraram os seguintes valores na área de estudo: $H' = 0,9946229$; $J' =$

0,308997. O número de espécies capturadas em toda coleta foi de 23 espécies, mostrando a diversidade de espécies capturadas em Casa Branca.

A Tabela 3 apresenta as espécies de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de cada residência de coleta. A Casa 2 foi o local com maior número de flebotomíneos coletados (6.166), enquanto a Casa 9 obteve menor número de flebotomíneos coletados (3) em todo período de coleta.

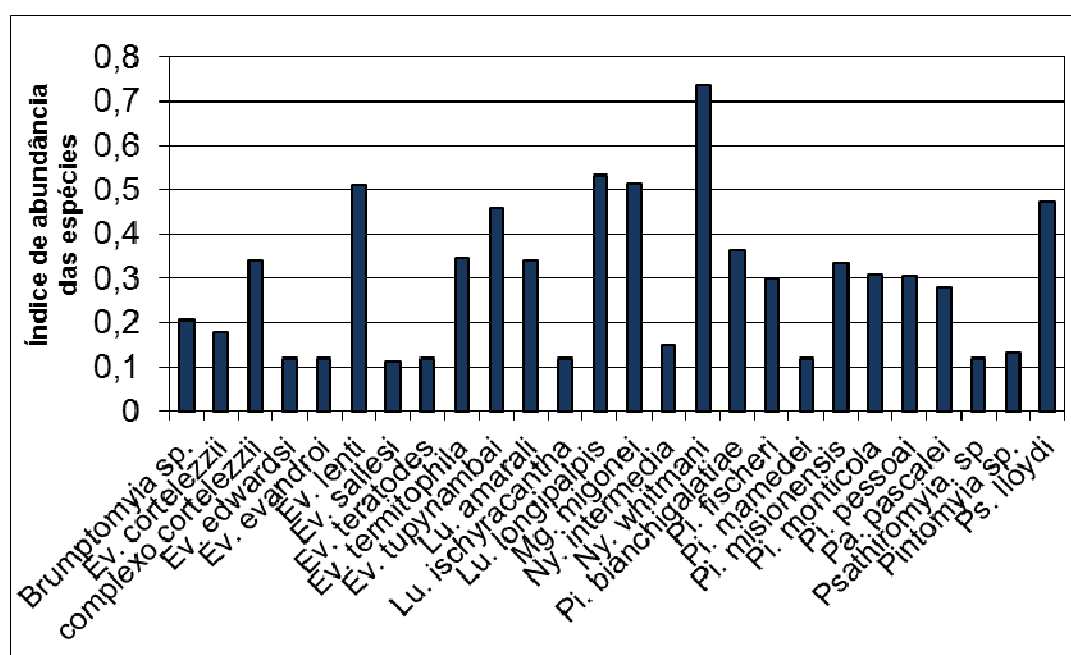
Quanto às espécies de flebotomíneos, *Ny. whitmani* foi a espécie mais abundante sendo a única espécie capturada em todos os pontos de coleta. Outras espécies foram mais frequentes no peridomicílio das residências como *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Ps. lloydi* sendo encontradas em sete dos nove locais de coleta em Casa Branca (Tabela 3).

TABELA 3. Distribuição dos flebotômíneos coletados nos pontos de coleta em Casa Branca, Brumadinho, Mians Gerais no período de maio de 2013 a julho de 2014.

Espécie	Casa 1		Casa 2		Casa 3		Casa 4		Casa 5		Casa 6		Casa 7		Casa 8		Casa 9		Total		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Brumptomyia</i> sp.	3	4	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	11
Complexo <i>cortelezzii</i>	0	0	0	4	0	5	0	0	0	0	0	0	0	17	0	11	0	1	0	38	38
<i>E. cortelezzii</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0	0	0	10	0	10
<i>Ev. edwardsi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
<i>Ev. evandroi</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Ev. lenti</i>	0	1	8	6	0	1	0	0	34	31	0	0	12	1	0	3	0	0	54	43	97
<i>Ev. sallesi</i>	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	3	1	2	1	0	0	5	0	5
<i>Ev. teratodes</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Ev. termitophila</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	11	11
<i>Ev. tupynambai</i>	1	0	0	0	2	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	4	15	19
<i>Lu. amarali</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	3
<i>Lu. ischyraantha</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Lu. longipalpis</i>	1	4	572	164	14	1	1	0	5	2	0	0	953	199	529	106	0	0	2075	476	2551
<i>Mg. migonei</i>	36	11	91	32	529	110	1	0	0	0	2	0	502	142	52	25	0	0	1213	320	1533
<i>Ny. intermedia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	2	2	4
<i>Ny. whitmani</i>	75	109	3184	1841	296	314	2	0	21	4	1	1	1713	1429	1351	1540	2	0	6645	5238	11883
<i>Pi. bianchigalatae</i>	0	1	0	41	0	6	0	0	0	0	0	0	1	25	0	2	0	0	1	75	76
<i>Pi. fischeri</i>	9	24	29	80	49	12	0	0	0	0	0	0	14	27	10	3	0	0	111	146	257
<i>Pi. mamedei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pi. misionensis</i>	0	1	0	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
<i>Pi. monticola</i>	0	0	3	27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0	6	35	41
<i>Pi. pessoai</i>	0	1	3	9	0	12	0	0	0	0	0	0	3	16	1	3	0	0	7	41	48
<i>Pa. pascalei</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1	4
<i>Psathyromyia</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pintomyia</i> sp.	0	0	0	11	0	3	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	23	23
<i>Ps. lloydi</i>	5	25	3	46	4	19	0	0	1	0	0	1	1	15	3	19	0	0	17	125	142
Total	130	182	3895	2271	899	509	4	0	61	37	4	4	3211	1900	1953	1715	2	1	10159	6612	
	312		6166		1408		4		98		8		5111		3668		3		16771		

De acordo com o “índice padronizado de abundância das espécies – SISA” as espécies mais abundantes na localidade de estudo estão apresentadas no Gráfico 1. Esse índice avalia abundância das espécies em valores distribuídos em uma escala de 0 a 1. A espécie *Ny. whitmani* foi a mais abundante apresentando valor SISA 0,74, seguida pelas espécies *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Ev. lenti* (valor de SISA 0,53; 0,51 e 0,51 respectivamente).

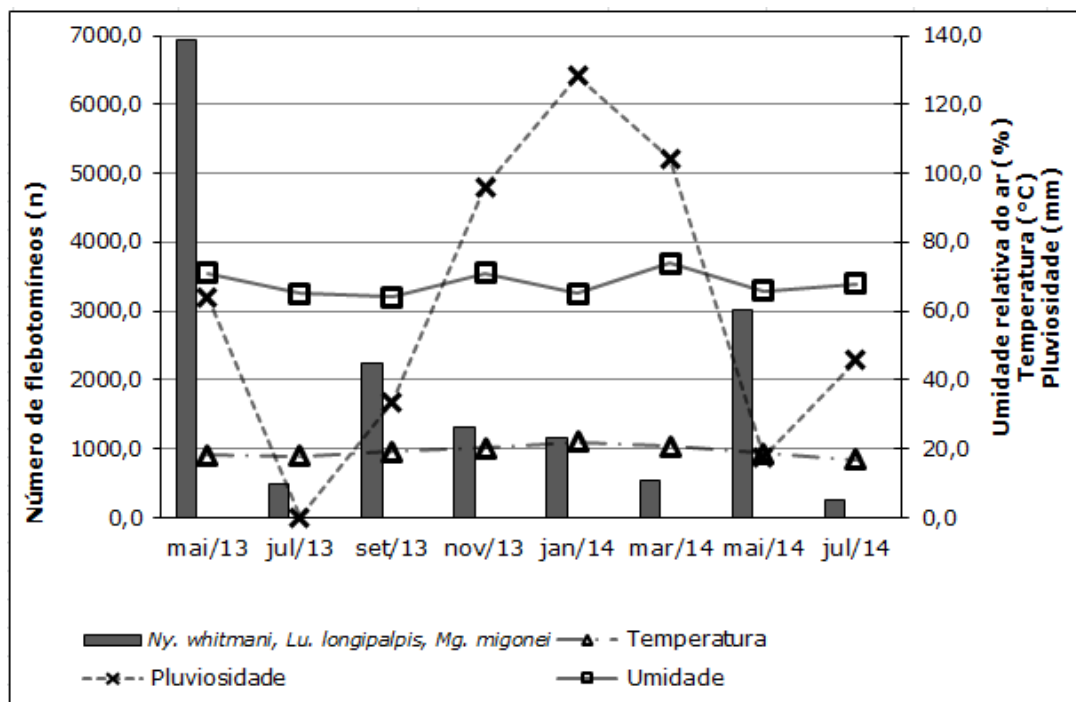
GRÁFICO 1. Índice padronizado de abundância das espécies coletadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.



Os parâmetros climáticos de temperatura e umidade relativa do ar se apresentaram com pouca variação durante o período de estudo. As temperaturas médias variaram entre 16,8°C a 22,1°C e a umidade relativa do ar variou entre 64% a 74%. A pluviosidade apresentou uma maior variação com a mínima registrada no mês de julho de 2013 (0 mm³) e maiores valores atingidos no mês de janeiro de 2014 (128,2 mm³), porém, ainda assim houve pouca variação dos níveis pluviométricos nos meses de estudo. O número de indivíduos coletados tem uma fraca correlação positiva com a temperatura (0,19 – Correlação de Spearman) e uma aparente ausência de correlação entre a umidade e pluviosidade (0,012 e -0,024 Correlação de Spearman respectivamente). Não houve correlação significativa entre o número de flebotomíneos coletados em cada mês com os dados climáticos de

temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade ($p\text{-value} < 0,05$ – Correlação de Spearman) (Gráfico 2).

GRÁFICO 2. Relação da variação sazonal entre o número das espécies de flebotomíneos mais capturados no peridomicílio e as variáveis climáticas no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Minas Gerais.



5.2 Estudo de detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos

As fêmeas não alimentadas provenientes das coletas dos meses de maio/2013, setembro/2013, janeiro/2014 e maio/2014 foram destinadas à pesquisa de DNA de *Leishmania* por meio das técnicas de biologia molecular. Um total de 4.913 fêmeas distribuídas em 18 espécies foram analisadas. Deste total, 47 fêmeas foram testadas individualmente e 4.866 agrupadas em 311 pools. A Tabela 4 traz informações a cerca das espécies coletadas e suas distribuições para análise molecular. A espécie *Ny. whitmani* foi a mais abundante obtendo o maior número de pools (4.128 espécimes/220 pools), seguida de *Lu. longipalpis* (248/19), *Mg. migonei* (144/14) e *Ps. lloydi* (115/18).

TABELA 4. Espécies de fêmeas de flebotomíneos analisadas em pools e individualmente coletadas no peridomicílio no período de maio de 2013 a julho de 2014 em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.

Espécies	Fêmeas coletadas	Número de pools analisados	Espécies analisadas individualmente
<i>Brumptomyia</i> sp.	4	1	0
Complexo <i>cortelezzii</i>	25	5	3
<i>Evandromyia edwardsi</i>	1	0	1
<i>Evandromyia lenti</i>	31	4	3
<i>Evandromyia teratodes</i>	1	0	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	6	1	4
<i>Evandromyia tupynambai</i>	13	2	1
<i>Lutzomyia amarali</i>	1	0	1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	248	19	0
<i>Migonemyia migonei</i>	144	14	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4128	220	0
<i>Pintomyia bianchigalatiae</i>	47	8	2
<i>Pintomyia fischeri</i>	80	13	0
<i>Pintomyia misionensis</i>	4	0	4
<i>Pintomyia monticola</i>	27	3	3
<i>Pintomyia pessoai</i>	16	3	1
<i>Pintomyia</i> sp.	21	0	21
<i>Psathyromyia pascalei</i>	1	0	1
<i>Psychodopygus lloydi</i>	115	18	1
Total	4913	311	47

Um total de nove pools foram PCR-positivos para *Leishmania*, sendo um pool da espécie *Lu. longipalpis*, seis pools de *Ny. whitmani* e dois pools de *Ps. lloydi* (Tabela 5). A taxa de infecção obtida para *Leishmania* foi de 0,18% (9/4.913). Outros dez pools foram positivos para outras espécies de tripanossomatídeos que não *Leishmania*. Nenhuma amostra analisada individualmente neste estudo foi PCR-positiva para *Leishmania*.

TABELA 5. Detecção de DNA e identificação de espécies de Trypanosomatidae nas fêmeas de flebotomíneos de acordo com o número do pool e data de coleta em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, de maio de 2013 a julho de 2014.

Espécie	Número do pool	Data de coleta	Sequenciamento
<i>Lu. longipalpis</i>	Pool 2	mai/13	<i>Leishmania amazonensis</i> (id: 96%, qc: 87%, ref: DQ300188.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 14	mai/13	<i>Herpetomonas pessoai</i> (id: 89%, qc: 78%, ref: JQ406989.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 27_300	mai/13	<i>Herpetomonas pessoai</i> (id: 91%, qc: 80%, ref: JQ406990.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 27_400	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%; ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 34_300	mai/13	<i>Leishmania amazonensis</i> (id: 100%, qc: 100%, ref: KP274862.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 34_400	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%, ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 44_300	mai/13	<i>Leishmania braziliensis</i> (id: 95%, qc: 95%, ref: FJ753382.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 44_400	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%; ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 46_300	mai/13	<i>Leishmania amazonensis</i> (id: 100%, qc: 90%, ref: DQ300193.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 46_400	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%; ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 58_300	mai/13	<i>Leishmania braziliensis</i> (id: 99%, qc: 92%, ref: HG512940.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 58_400	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%; ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 61	mai/13	<i>Endotrypanum monterogeii</i> (id: 100%; ref: EL) ¹
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 63	mai/13	<i>Leishmania amazonensis</i> (id: 99%, qc: 98%, ref: KP274862.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 75_2013	mai/13	<i>Herpetomonas pessoai</i> (id: 97%, qc: 77%, ref: JQ406991.1)
Complexo <i>cortezii</i>	Pool 132	mai/13	<i>Herpetomonas pessoai</i> (id: 96%, qc: 88%, ref: JQ406991.1)
<i>Ny. whitmani</i>	Pool 39	set/13	<i>Leishmania amazonensis</i> (id: 98%, qc: 86%, ref: DQ300190.1)
<i>Ps. lloydi</i>	Pool 73_300_R	mai/14	<i>Leishmania</i> sp. (id: 97%, qc: 21%, ref: HG512895.1)
<i>Ps. lloydi</i>	Pool 73_400_F	mai/14	<i>Crithidia fasciculata</i> (id: 81%, qc: 68%, ref: KX808126.1)
<i>Ps. lloydi</i>	Pool 75_2014	mai/14	<i>Leishmania braziliensis</i> (id: 99%, qc: 100%, ref: FJ753383.1)

Legenda: id- Identidade; qc- query cover (cobertura); ref: referência.

¹ Sequência de tripanossomatídeo obtida a partir da cepa A9 de origem da Coleção de Protozoários do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro e depositada na Coleção de Protozoários do Grupo de Estudos em Leishmanioses (EL).

Os pools pertencentes à espécie *Ny. whitmani* (seis pools) foram positivos para DNA de duas espécies de *Leishmania*, sendo quatro pools detectados com *Le. amazonensis* (0,08%) e dois pools com *Le. braziliensis* (0,04%) (Tabela 5). Um pool da espécie *Ps. lloydi* foi detectado com DNA de *Le. braziliensis* (0,02%) e outro pool detectado com *Leishmania* sp. (0,02%). A espécie *Lu. longipalpis* (um pool) foi detectada com DNA de *Le. amazonensis* (0,02%) (Tabela 5).

Um alto número de pools positivos (n = 10) (Tabela 5) com taxa de infecção natural de 0,20% (10/4913) para ITS1-PCR revelaram a presença de bandas de tamanho inconsistente (400-500 pb) com os fragmentos esperados para espécies de *Leishmania*. Na figura 7 é possível observar algumas das amostras testadas na PCR para o alvo ITS1 apresentando o tamanho de fragmento de pares de bases maior que o esperado para *Leishmania*.

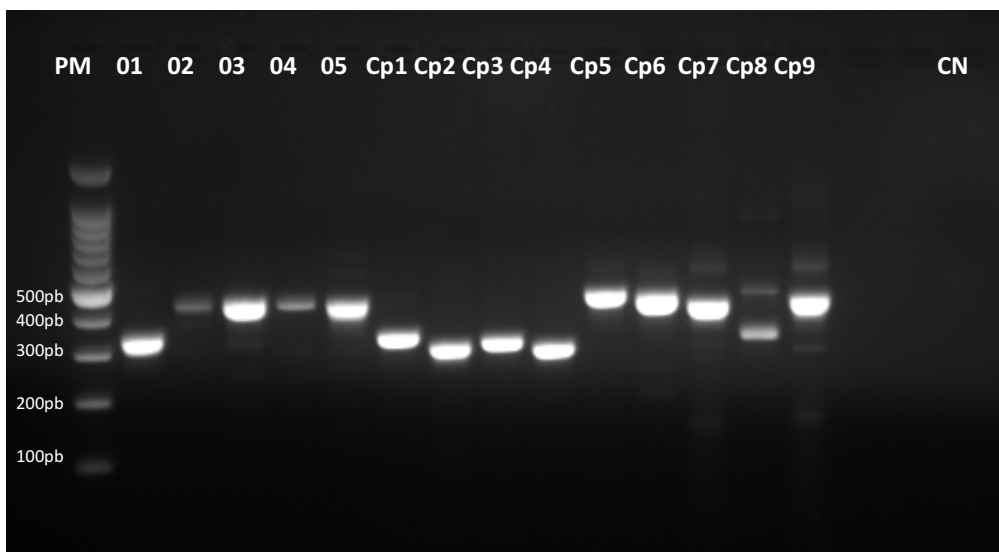


Figura 7. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados da PCR-ITS1 de alguns pools das fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio de Casa Branca no período de maio de 2013 a julho de 2014. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; 01 a 05 fêmeas de flebotomíneos; Cp1 - controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); Cp2 - controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Cp3 - controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Cp4 - controle positivo de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); Cp5 - controle positivo *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048); Cp6 - controle positivo *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151); Cp7 - controle positivo *Leptomonas collosoma* (COLPROT 073); Cp8 - controle positivo *Herpetomonas samuelpeessoai* (COLPROT 067); Cp9 - controle positivo *Phytomonas serpens* (COLPROT 189); e CN - controle negativo (apenas reagentes de PCR sem DNA).

Esses resultados nos levaram a investigar a identidade desses fragmentos e três espécies de tripanossomatídeos foram identificadas a partir dos fragmentos de ITS1. O tripanossomatídeo *Crithidia* sp. foi detectado em um pool da espécie de flebotomíneo *Ps. lloydi* (0,02%). Além disso, em três pools de *Ny. whitmani* foram detectadas *Herpetomonas* sp. (0,06%) e seis pools desta mesma espécie de flebotomíneo foram positivos para *Endotrypanum* sp. (0,12%). *Herpetomonas* sp. também foi detectada no único pool positivo pertencente a uma espécie do complexo *cortelezzii* (0,02%) (Tabela 6).

Além disso, neste estudo foi possível detectar infecção por mais de uma espécie de tripanossomatídeo em um mesmo pool, sendo os cinco pools pertencentes a espécie *Ny. whitmani*, e um pool pertencendo à espécie *Ps. lloydi* (Tabela 5). Assim, 14 pools foram detectados com algum tipo de tripanossomatídeo, sendo identificadas um total de 20 sequências de tripanossomatídeos nesses 14 pools.

TABELA 6. Espécies de fêmeas de flebotomíneos detectadas com DNA de Trypanosomatidae coletadas em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.

Espécies	Número de fêmeas analisadas	Amostras positivas para <i>Leishmania</i> sp.	Amostras positivas <i>Leishmania amazonensis</i>	Amostras positivas <i>Leishmania braziliensis</i>	Amostras positivas para <i>Crithidia</i> sp.	Amostras positivas para <i>Endotrypanum</i> sp.	Amostras positivas para <i>Herpetomonas</i> sp.
<i>Complexo cortelezii</i>	25	0	0	0	0	0	1
<i>Lu. longipalpis</i>	248	0	1	0	0	0	0
<i>Ny. whitmani</i>	4128	0	4	2	0	6	3
<i>Ps. lloydi</i>	115	1	0	1	1	0	0
Total	4516	1	5	3	1	6	4

A técnica de PCR-RFLP foi utilizada nos pools considerados positivos na PCR convencional, porém os resultados não foram satisfatórios para todos os pools testados. Por se tratar de pools com infecção por outros tripanossomatídeos em que alguns não possuem perfis de restrição na PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Hae III* para o alvo ITS1, ou por se tratar de infecção por mais de um tipo de tripanossomatídeo no mesmo pool, a técnica PCR-RFLP não demonstrou sucesso na grande maioria das amostras (Figura 8) mostrando perfis inconclusivos.

Diante disso, o sequenciamento de DNA foi utilizado em todos os pools positivos na PCR convencional para se chegar à identificação a nível de espécie do parasita.

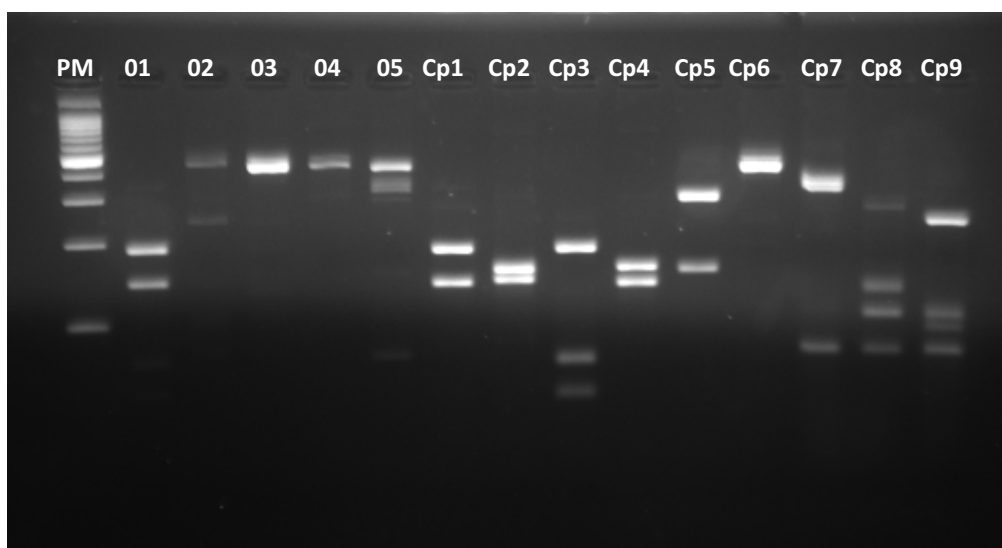


Figura 8. Gel de agarose 4% corado com brometo de etídio mostrando os produtos digeridos da PCR-RFLP do alvo ITS1 de alguns pools das fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio de Casa Branca no período de maio de 2013 a julho de 2014. Canaletas: PM 100pb - peso molecular de 100pb; 01 a 05 fêmeas de flebotomíneos; Cp1 - controle positivo de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); Cp2 - controle positivo de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Cp3 - controle positivo de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), Cp4 - controle positivos de *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); Cp5 - controle positivo *Crithidia fasciculata* (COLPROT 048); Cp6 - controle positivo *Endotrypanum monterogeii* (COLPROT 151); Cp7 - controle positivo *Leptomonas collosoma* (COLPROT 073); Cp8 - controle positivo *Herpetomonas samuelpessoai* (COLPROT 067); Cp9 - controle positivo *Phytomonas serpens* (COLPROT 189).

Na árvore de neighbor-joining (Figura 9), os pools foram agrupados de acordo com a similaridade das sequências do alvo ITS1, comparadas com as sequências depositadas no Genbank. Todos os 14 pools positivos (total de 20 amostras) para algum tripanossomatídeo analisados nesse estudo se mostram arranjados em

clados bem definidos como observado na Figura 9. Os grupos das espécies de tripanossomatídeos *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas pessoai* e *Le. amazonensis*, deixa claro a relação de proximidade com os pools analisados. Os três pools detectados com a espécie *Le. braziliensis* pelo sequenciamento também formaram um grupo, apesar de haver também uma proximidade com espécies de *Le. guyanensis*, por se tratar de espécies do mesmo subgênero *Viannia* e haver uma dificuldade de distinção entre as espécies deste subgênero através do alvo molecular ITS1.

O clado formado por *Endotrypanum monterogeii*, *Le. naiffi* e *Le. lainsoni* mostra a similaridade do fragmento ITS1 de *Endotrypanum* com essas espécies de *Leishmania*, porém, os pools analisados detectados com *Endotrypanum* sp. se mostraram mais próximos da sequência da cepa referência de *Endotrypanum monterogeii* (EL), com exceção do Pool 58_400 (Figura 9).

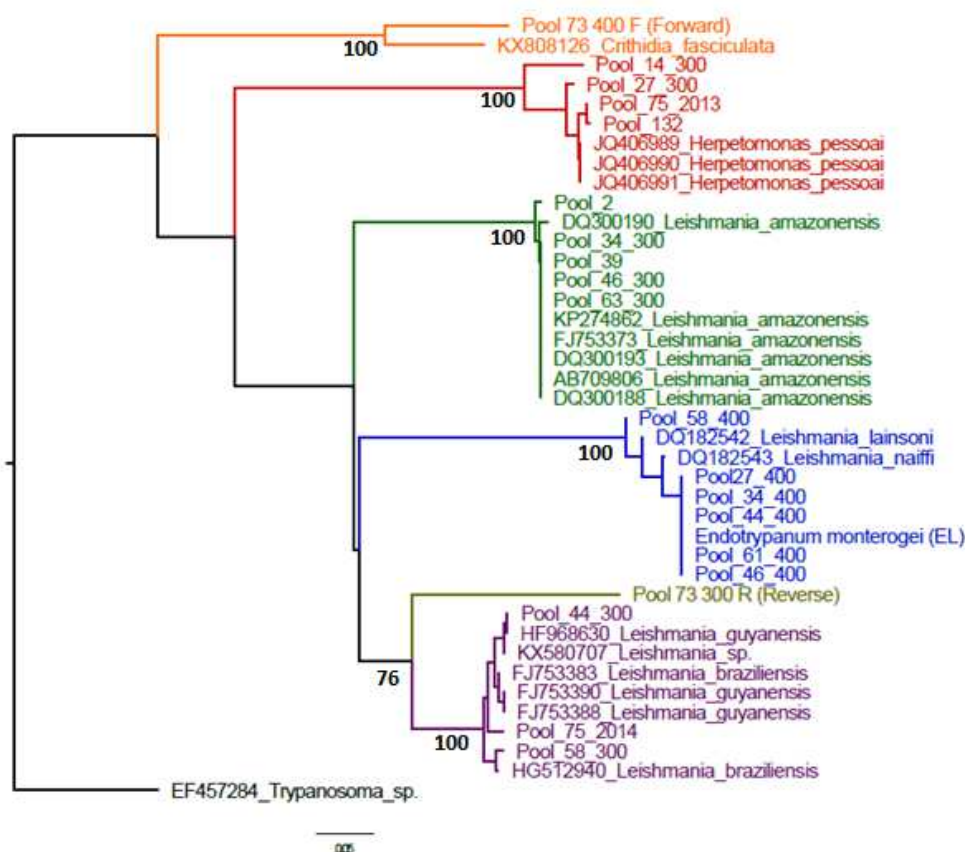


Figura 9. Árvore mostrando a relação entre tripanossomatídeos detectados nos pools das fêmeas de flebotomíneos inferida pelo método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os taxons são agrupados no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método da distância-p e estão nas unidades do número de diferenças de base por local. A análise envolveu 39 sequências de nucleótidos.

Cabe ressaltar neste caso que como não há sequências do ITS1 de *Endotrypanum monterogeii* depositadas no GenBank, a comparação entre as cepas para a construção da árvore foi feita com o DNA de *Endotrypanum monterogeii* (EL) originário da Coleção de Protozoários cedida pelo Laboratório Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz, utilizado como controle exógeno da reação de PCR.

5.3 Identificação de fonte alimentar sanguínea das fêmeas de flebotomíneos

No período de coleta entre maio de 2013 e julho de 2014 foi obtido um total de 362 fêmeas alimentadas, pertencendo às espécies: *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei*, *Ny. whitmani*, *Pi. bianchigalatae*, *Pi. fischeri*, *Pi. pessoai*, *Pintomyia* sp., *Ps. lloydi* e complexo *cortezzezii* (Tabela 7).

TABELA 7. Espécies de fêmeas alimentadas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais, no período de maio de 2013 a julho de 2014.

Espécies	Número de fêmeas alimentadas	%
Complexo <i>cortezzezii</i>	4	1,1
<i>Lu. longipalpis</i>	91	25,1
<i>Mg. migonei</i>	53	14,7
<i>Ny. whitmani</i>	199	55
<i>Pi. bianchigalatae</i>	5	1,4
<i>Pi. fischeri</i>	3	0,8
<i>Pi. pessoai</i>	4	1,1
<i>Pintomyia</i> sp.	2	0,6
<i>Ps. lloydi</i>	1	0,2
Total	362	100

A figura 10 mostra a porcentagem das espécies das fêmeas ingurgitadas mais capturadas no peridomicílio da área de estudo. A espécie *Ny. whitmani* (55%) foi a mais abundante coletada durante o período de maio de 2013 a julho de 2014, seguida por *Lu. longipalpis* (25,1%) e *Mg. migonei* (14,7%). As demais espécies somaram 5,2%.

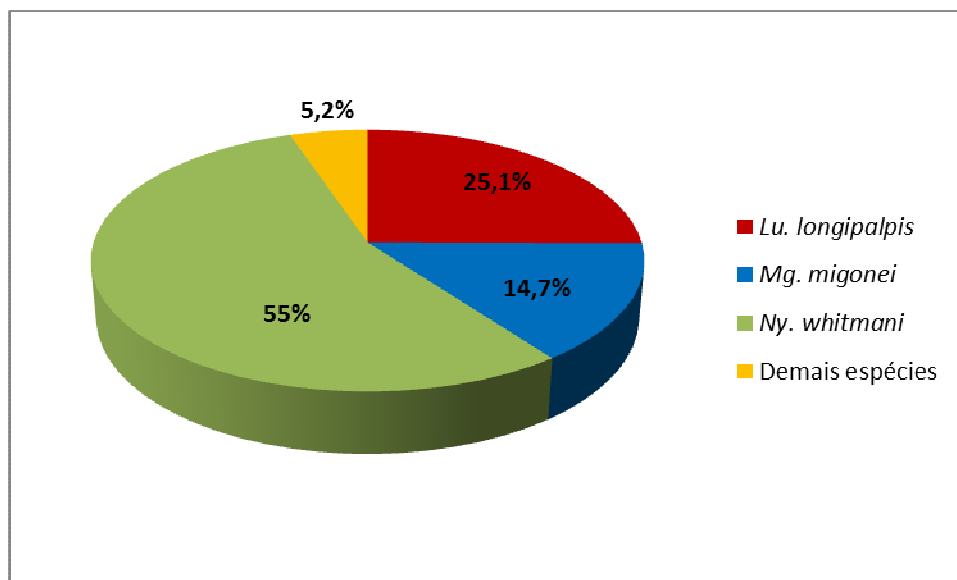


Figura 10. Porcentagem das espécies de fêmeas alimentadas mais capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, no período de maio de 2013 a julho de 2014.

A amplificação de um fragmento que codifica uma sequência de 359 pb do gene *Cyt b*, produziu o produto de amplificação esperado em 192 fêmeas de flebotomíneos (53%), do total de 362 fêmeas analisadas (Figura 11).

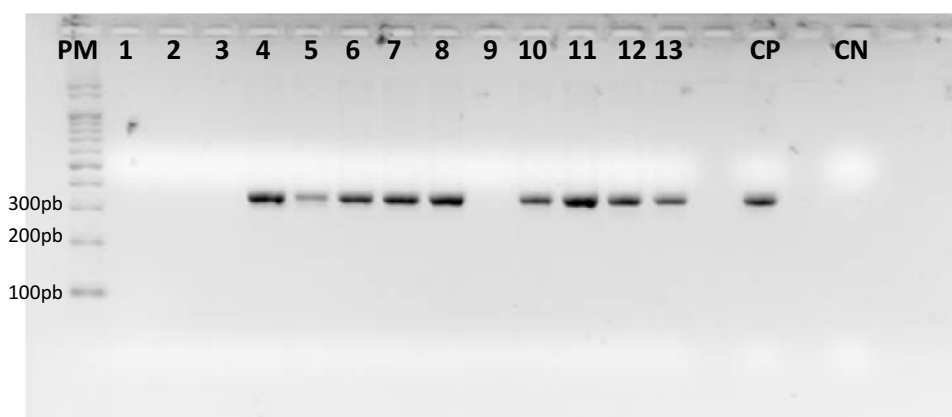


Figura 11. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados da PCR do *Cyt b* a partir da extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos individuais coletadas no peridomicílio de Casa Branca, Minas Gerais. Canaletas: PM – Peso molecular 100pb; 1 – macho de *Lu. longipalpis* (controle negativo interno); 2 a 13 – fêmeas de flebotomíneos capturadas com sinais de ingurgitamento; CP – controle positivo (amostras de sangue de cão); CN – controle negativo (apenas reagentes da PCR sem DNA).

O resultado do sequenciamento genético a partir da amplificação do gene do *Cyt b* mostrou que as fêmeas se alimentaram em quatro hospedeiros vertebrados: *Gallus gallus* (49,5%), *Canis familiaris* (26%), *Homo sapiens* (23,4%) e *Rattus rattus* (1,1%) (Figura 12).

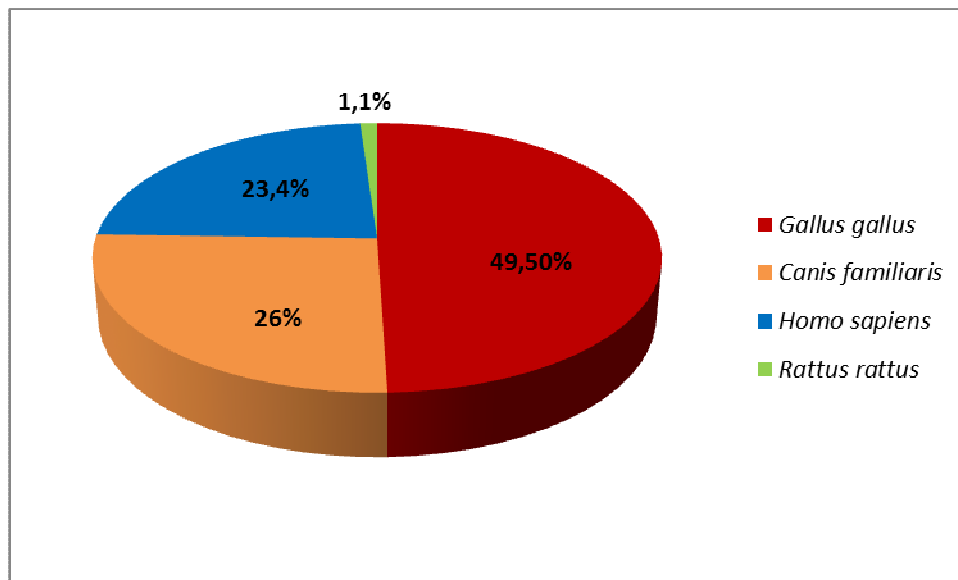


Figura 12. Porcentagem dos hospedeiros vertebrados identificados como fonte alimentar para fêmeas de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de Casa Branca, Brumadinho, período de maio de 2013 a julho de 2014.

A Tabela 8 mostra a detecção molecular do sangue de hospedeiros vertebrados em fêmeas de flebotomíneos coletadas no peridomicílio de Casa Branca.

TABELA 8. Total de fêmeas de flebotomíneos capturadas alimentadas e espécies de vertebrados identificados a partir da análise do sangue ingerido em Casa Branca, Brumadinho, Minas Gerais.

Espécies	Total de fêmeas de flebotomíneos alimentadas (%)	Total de identificação fonte alimentar (%)	Identificação da fonte alimentar			
			<i>Canis familiaris</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus rattus</i>
			(%)	(%)	(%)	(%)
Complexo cortellezzii	4 (1.1)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
<i>Lu. longipalpis</i>	91 (25.1)	51 (26.6)	12 (24)	8 (8,4)	31 (68.8)	0 (0)
<i>Mg. migonei</i>	53 (14.7)	51 (26.6)	15 (30)	28 (29.5)	6 (13.5)	2 (100)
<i>Ny. whitmani</i>	199 (55)	84 (43.8)	23 (46)	55 (58)	6 (13.5)	0 (0)
<i>Pi. bianchigalatiae</i>	5 (1.4)	2 (1)	0 (0)	1 (0.9)	1 (2)	0 (0)
<i>Pi. fischeri</i>	3 (0.8)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)
<i>Pi. pessoai</i>	4 (1.1)	2 (1)	0 (0)	2 (2.1)	0 (0)	0 (0)
<i>Pintomyia</i> sp.	2 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Ps. lloydi</i>	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total (%)	362 (100)	192 (100)	50 (26) *	95(49.5)*	45 (23.4) *	3 (1.1) *

*O total e a percentagem de identificação da fonte alimentar para cada hospedeiro vertebrado referente ao total de 192 fêmeas, das quais as fontes alimentares foram identificadas.

Foram encontradas três espécies de flebotomíneos com sinais de ingurgitamento em *Canis familiaris*: *Ny. whitmani* (46%), *Mg. migonei* (30%) e *Lu. longipalpis* (24%). Seis espécies de flebotomíneos se alimentaram em *Gallus gallus*: *Ny. whitmani* (58%), *Mg. migonei* (29,5%), *Lu. longipalpis* (8,4%), *Pi. pessoai* (2,1%), *Pi. bianchigalatiae* (0,9%) e *Pi. fischeri* (0,9%), enquanto cinco espécies foram associadas ao repasto sanguíneo em *Homo sapiens*: *Lu. longipalpis* (69%), *Mg. migonei* (13,5%), *Ny. whitmani* (13,5%), complexo cortellezzi (2%) e *Pi. bianchigalatiae* (2%). Apenas duas fêmeas de *Mi. migonei* foram encontradas alimentando-se em *Rattus rattus*, sendo a espécie *Mg. migonei* a única dentre as

fêmeas ingurgitadas identificadas que se alimentou em todas as quatro fontes alimentares detectadas (Tabela 8).

6 DISCUSSÃO

6.1 Fauna de flebotomíneos

A diversidade de espécies encontrada no presente estudo pode ser explicada pelo fato de Casa Branca estar situada às margens do Parque Estadual Serra do Rola Moça, onde as residências selecionadas para coleta de flebotomíneos estão próximas ao ambiente de mata, rico em recursos naturais. Ao mesmo tempo, as residências apresentavam em seu peridomicílio condições propícias para o criadouro e manutenção da fauna de flebotomíneos como presença de vegetação (árvores frutíferas) e acúmulo de matéria orgânica no solo, além da criação de animais domésticos (galinhas, cães, porcos) que podem servir de fonte alimentar e abrigo para flebotomíneos.

Apesar de Casa Branca estar situada próxima ao Parque Estadual Serra do Rola Moça, uma área que conserva características de mata primária, esta localidade encontra-se em constante processo de urbanização com modificação do ambiente natural para construção de habitações e condomínios. Como consequência dessas mudanças, algumas espécies de flebotomíneos estariam se adaptando a esses novos ambientes modificados, como *Ny. whitmani* frequentemente encontrada em áreas recém desmatadas, condição já -pobservada por Barreto (1943). A predominância de *Ny. whitmani* também foi observada por Forattini (1960) em uma área de desmatamento de floresta primária, corroborando com nossos achados neste trabalho onde *Ny. whitmani* foi a espécie mais capturada na localidade de Casa Branca.

A espécie *Ny. whitmani* tem sido encontrada com frequência em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar americana nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, sendo incriminada como uma das principais espécies vetoras de *Le. braziliensis* em algumas regiões do país (Camargo-Neves et al., 2002; Costa et al., 2007; Virgens et al., 2008), além de ser uma espécie altamente atropofílica (Brazil et al., 1991). Além disso, *Ny. whitmani* também já foi detectada com DNA de *Le. infantum* no estado de Minas Gerais (Saraiva et al., 2010; Margonari et al., 2010), apesar de não se saber seu papel na transmissão desta espécie de *Leishmania*.

Neste trabalho, *Ny. whitmani* foi a espécie capturada em maior abundância no peridomicílio do local de estudo (70,9%), evidenciando sua presença em grande densidade próximas às residências. Esses achados corroboram com estudos em que esta espécie foi capturada em maior abundância em áreas urbanas no estado de Minas Gerais (Saraiva et al., 2011, Souza et al., 2014). A presença de *Ny. whitmani* associada ao registro de casos de LTA na localidade de Casa Branca pode sugerir a participação desta espécie na transmissão da doença nesta área.

A espécie *Lu. longipalpis* principal vetor de *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Lainson & Shaw, 1979) foi a segunda espécie mais coletada em Casa Branca (15,2%), também se mostrando frequente no peridomicílio. Esse encontro comprova a adaptação desta espécie ao ambiente em urbanização, e associada às condições encontradas nas residências de Casa Branca – onde existe criação de cães, galinhas e porcos – confirma seu alto grau de adaptação ao ambiente peridomiciliar (Barata et al., 2005; Macedo-Silva et al., 2014; Salomón et al., 2015).

Migonemyia migonei foi a terceira espécie mais capturada na área de estudo com 9,1%, considerada uma espécie antropofílica (Rangel & Lainson, 2003; Moschin et al., 2013). Em estudo realizado no estado de Pernambuco, Carvalho et al. (2010) encontraram *Mg. migonei* predominantemente no peridomicílio, além de detectar esta espécie infectada naturalmente por *Le. infantum*, sugerindo que *Mg. migonei* poderia ser a espécie vetora em áreas endêmicas para leishmaniose visceral na ausência de *Lu. longipalpis*.

O gênero *Evandromyia* compreendeu o maior número de espécies encontradas, totalizando oito espécies. Embora esse gênero não possua nenhuma espécie vetora comprovada, algumas espécies tem sido detectadas com DNA de *Leishmania*. Em estudos realizados no estado de Minas Gerais, Carvalho et al. (2008) encontraram fêmeas de *Ev. cortelezzii* infectadas naturalmente por *Le. infantum*, assim como fêmeas de *Ev. sallesi* também detectadas com infecção natural pela mesma espécie de *Leishmania* (Saraiva et al., 2009). Esses achados vem conferindo a essas espécies do complexo *cortelezzii* (fêmeas de *Ev. cortelezzii* e *Ev. sallesi* indistinguíveis morfologicamente) importância do ponto de vista epidemiológico, uma vez que vem sendo encontradas com certa frequência no ambiente urbano.

Outra espécie também coletada na área de estudo foi *Ev. lenti*, espécie que ainda não se sabe sobre o seu real papel na transmissão de *Leishmania*, apesar de já ter sido encontrada com DNA do parasita (Margonari et al., 2010).

Pintomyia foi o segundo gênero que mais somou espécies capturadas, totalizando seis. Algumas espécies desse gênero tem se mostrado frequentes no peridomicílio em associação com abrigos de animais domésticos, além de possuir caráter antropofílico (Rangel & Lainson, 2003, 2009). Além disso, algumas espécies já foram detectadas com DNA de *Leishmania* em algumas regiões do Brasil, associadas à transmissão da doença em área endêmica (Forattini et al., 1972; Silva et al., 1999; Rocha et al., 2010; Pita-Pereira et al., 2011).

Os pontos de coletas de flebotomíneos apresentaram grande diferença quanto ao número de indivíduos capturados. A Casa 2 (6.166) e Casa 7 (5.111) apresentaram o maior número de flebotomíneos capturados em toda coleta. O peridomicílio dessas casas possuía criação de animais como galinhas e cães, e ambos também apresentavam grande quantidade de árvores frutíferas e acúmulo de matéria orgânica no solo. O ambiente dessas duas casas apresentava características semelhantes e condições propícias para a manutenção dos flebotomíneos, como abrigo de animais e disponibilidade de fontes alimentares que podem atrair estes flebotomíneos para este local, assim como a presença de árvores frutíferas que pode funcionar como possível criadouro das larvas, determinando a presença de maior quantidade de flebotomíneos em um ponto de coleta. Outras residências de coleta como a Casa 9 e a Casa 4 obtiveram o menor número de flebotomíneos capturados (somente 3 e 4 indivíduos, respectivamente). Essas casas apresentavam presença de cães no peridomicílio e árvores frutíferas, porém, eram residências mais próximas à mata e não possuíam criação de galinhas. Este pode ser um fator que poderia determinar a menor ocorrência de flebotomíneos no peridomicílio, uma vez que os flebotomíneos são atraídos por galinhas e se alimentam dessa fonte (Genaro et al., 1990; Barata et al., 2005; Missawa et al., 2008). Outros fatores também poderiam estar relacionados à variação da abundância de flebotomíneos nos locais de coleta como a limpeza dos quintais realizada pelos moradores, o microclima em determinado local, a proximidade com a área de mata e menor oferta de fontes alimentares neste ambiente.

A maior taxa do índice de padronização (SISA) encontrada neste estudo foi para espécie *Ny. whitmani* (0,74). Este alto valor confirma a abundância dessa

espécie no presente estudo evidenciando sua dominância sobre outras espécies em Casa Branca, padrão também encontrado em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar no Brasil (Loiola et al., 2007, Colla-Jacques et al., 2010).

Em relação aos índices de Shannon e de Pielou observou-se que apesar da área de coleta compreender uma grande diversidade de espécies, a abundância dessas espécies não é distribuída uniformemente, estando a maior quantidade de flebotomíneos concentrada na espécie *Ny. whitmani*. Este fato pode explicar o baixo valor encontrado para o índice de Pielou, uma vez que a grande abundância encontrada em uma única espécie tende a concentrar uma menor uniformidade nas demais espécies. Em ambientes peridomiciliares é comum observar esse perfil, como encontrado por Loiola et al., (2007) no Sudeste de Minas Gerais, em que o índice de equitabilidade das espécies foi baixo neste ambiente, provavelmente pela maior abundância da espécie *Ny. whitmani* em relação às demais.

A correlação entre a variação sazonal dos flebotomíneos e os parâmetros climáticos analisados não obteve significância estatística de acordo com a correlação de Spearman. Tal fato pode ser explicado pela pouquíssima variação da umidade relativa do ar, temperatura média e pluviosidade de cada mês no período de estudo, uma vez que uma maior variação destes fatores no ambiente pode ser suficiente para que a dinâmica das populações de flebotomíneos fosse alterada. Assim, outros fatores não testados poderiam explicar a variação na quantidade de flebotomíneos coletados em cada mês, como a presença de hospedeiros que pode se modificar ao longo do ano nos locais de coleta, o tipo de vegetação que também pode ser alterado em um ano ou até mesmo microclimas característicos a cada local de coleta. Todos estes fatores poderiam influenciar na distribuição da população de flebotomíneos ao longo do ano em Casa Branca. Um outro aspecto que deve ser ressaltado em relação aos dados climáticos é que as medições dos parâmetros foram realizadas somente nos meses de captura de flebotomíneos (maio/13, julho/13, setembro/13, novembro/13, janeiro/14, março/14, maio/14 e julho/14), onde os meses que intercalam o período de estudo não foram avaliados. Nesses meses em que não houve a medição das variáveis climáticas, poderia ocorrer uma maior oscilação dos parâmetros climáticos que associados ao mês de coleta poderiam interferir na dinâmica de populações dos flebotomíneos no local.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o período de estudo no presente trabalho. Sabe-se que para conferir maior confiabilidade dos dados de

sazonalidade é interessante ter um período de estudos de pelo menos dois anos consecutivos. Assim, é possível comparar os resultados dos anos, bem como amenizar a margem de erros ocasionados por condições atípicas de um determinado ano. Por isso, o número de coletas talvez não tenha sido suficiente para averiguar as relações de temperatura, umidade e pluviosidade com o número de indivíduos coletados.

No entanto, as variáveis climáticas podem estar associadas a maior ou menor abundância de flebotomíneos em um determinado período, onde já foi observado um pico de flebotomíneos capturados em períodos quentes e úmidos (Souza et al., 2002, Saraiva et al., 2015). Porém, neste presente estudo esses parâmetros não foram suficientes para determinar a abundância dos flebotomíneos nos meses estudados, assim como observado por Dias et al. (2007) no estado de Minas Gerais.

O período de maior captura de flebotomíneos no local de estudo foi o mês de início das coletas em Casa Branca, em maio de 2013. Além disso, no mês de maio de 2014 também foi coletado um número elevado de flebotomíneos, sendo o mês de maio compreendido após meses de altos índices pluviométricos. Oliveira et al. (2003) já haviam feito observações semelhantes na zona urbana de Campo Grande, coletando maior número de flebotomíneos em seguida aos meses que registraram maiores volumes de chuva. Machado et al. (2012) também coletaram maior diversidade e abundância de espécies na estação chuvosa, corroborando com os nossos achados. Acredita-se que o aumento da umidade relativa do ar após períodos de chuva favoreça o desenvolvimento das larvas dos flebotomíneos (Forattini, 1973), conseqüentemente aumentando a densidade de flebotomíneos nesse período.

Este é o primeiro estudo sobre fauna de flebotomíneos realizado no município de Brumadinho, Minas Gerais. Nossos achados demonstram que a localidade Casa Branca obteve diversidade quanto a fauna de flebotomíneos, apresentando espécies já relatadas para o estado de Minas Gerais, além do encontro das espécies de importância médica como *Ny. whitmani*, *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei*, em maior abundância no peridomicílio.

6.2 Detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos

Casa Branca é uma localidade que vem sofrendo constantes mudanças em seu ambiente natural, e essas modificações podem estar associadas ao surgimento de casos autóctones de leishmaniose tegumentar humana e visceral (humana e canina) na região. O conhecimento sobre a composição da fauna de flebotomíneos em Casa Branca se mostrou bastante diverso, sendo registradas 23 espécies de flebotomíneos. No entanto, até o momento, apesar dos casos autóctones de LT e LV notificados na localidade, não havia registros de isolamento ou caracterização molecular das espécies de *Leishmania* circulantes entre flebotomíneos em Casa Branca.

Pereira (2015) realizou um estudo entre os reservatórios sinantrópicos no peridomicílio das residências desta mesma área de estudo em Casa Branca, e detectou DNA de *Le. braziliensis* nas espécies de roedores *Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus*, e no marsupial *Didelphis albiventris*. Além disso, *Le. infantum* foi detectada também no roedor *Rattus rattus*. Estes achados mostram a presença das espécies *Le. braziliensis* e *Le. infantum* circulando entre os hospedeiros vertebrados no peridomicílio das residências da área de estudo, sugerindo que estas espécies de mamíferos poderiam servir como fonte de infecção para os flebotomíneos nesta localidade.

A maior parte dos pools positivos para *Leishmania* e outros tripanossomatídeos foi proveniente da primeira coleta realizada em maio de 2013 em Casa Branca. Nesse período, houve um maior número de flebotomíneos capturados (7.054) em uma única coleta. Adicionalmente, nesse período de coleta de maio de 2013 houve um grande número de espécies vetoras capturadas, como *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis*, onde conseqüentemente poderia haver maior chance de transmissão. Assim, a grande quantidade de flebotomíneos nesse período poderia resultar na maior chance de serem encontradas fêmeas de flebotomíneos detectadas com algum tipo de tripanossomatídeo. Além disso, o mês de maio está compreendido após meses de altos índices pluviométricos na estação chuvosa, circunstância esta que pode criar condições favoráveis nos microhabitats e explicar o aumento da população de flebotomíneos após meses de chuva (Souza et al., 2004, Michalsky et al., 2009, Barata et al., 2011). Outro aspecto importante é que Casa Branca está em constante modificação do ambiente natural para construção de condomínios, fato este que poderia desalojar os flebotomíneos do ambiente natural de mata e estes se adaptarem ao peridomicílio das residências.

A grande abundância de *Ny. whitmani* capturada no peridomicílio de Casa Branca evidencia a capacidade de adaptação desta espécie ao ambiente modificado (Forattini, 1960; Peterson & Shaw, 2003). Neste estudo, *Ny. whitmani* foi detectada com DNA de *Le. braziliensis*, onde poderia indicar que esta espécie estaria participando como vetora na área de estudo, assim como em trabalhos na literatura onde comprovam que *Ny. whitmani* tem seu papel como vetor em algumas regiões do Brasil (Costa et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Rangel & Lainson, 2009). A presença de *Ny. whitmani* com DNA de *Le. braziliensis*, juntamente com reservatórios sinantrópicos infectados pela mesma espécie de *Leishmania* na mesma área sugere que o ciclo de transmissão possa estar ocorrendo no peridomicílio das residências de Casa Branca.

Neste trabalho, quatro pools da espécie *Ny. whitmani* foram positivos para o DNA de *Le. amazonensis*. Tal achado pode ser atribuído ao fato de *Ny. whitmani* ser a espécie mais abundante capturada no peridomicílio da área de estudo, além da proximidade das residências de coleta de flebotômíneos ao ambiente de mata, onde podem ser encontrados os possíveis reservatórios silvestres deste parasito. Por outro lado, as mudanças no ambiente natural poderiam desencadear um novo padrão de transmissão das leishmanioses que poderia envolver novos reservatórios domésticos (Brasil, 2007; Reis, 2008). *Leishmania amazonensis* tem sido encontrada em cães por meio da técnica de PCR no estado de Minas Gerais (Dias et al. 2011, Valdivia et al. 2017) e flebotômíneos (Rêgo et al. 2015), chamando atenção para esta espécie de *Leishmania* que pode estar circulando entre flebotômíneos e hospedeiros vertebrados urbanos em Minas Gerais, fora da região amazônica. Somado a isso, em um estudo de infecção experimental realizado por Fonteles et al. (2016) foi possível infectar *Ny. whitmani* com *Le. amazonensis*, mostrando que esta espécie de flebotômíneo tem potencial para se infectar por outras espécies de *Leishmania*, sendo considerada como provável espécie vetora de *Le. amazonensis* no estado do Maranhão. Diante disso, *Ny. whitmani* poderia estar participando do ciclo de transmissão de *Le. amazonensis* em Casa Branca.

Lutzomyia longipalpis também foi outra espécie detectada positiva para DNA de *Le. amazonensis* neste trabalho. Esse flebotômíneo está adaptado ao ambiente urbano sendo frequentemente associado à criação de animais domésticos possuindo hábito alimentar eclético (Barata et al., 2005; Tanure et al., 2015), condição presente nos locais de coleta em Casa Branca. A proximidade das residências de coleta de flebotômíneos ao ambiente de mata e a criação de animais

no peridomicílio, associado ao ecletismo alimentar de *Lu. longipalpis*, torna possível a infecção desta espécie por outras espécies de *Leishmania*, uma vez que em trabalho de infecção experimental realizado por Gontijo et al. (1995), *Lu. longipalpis* se mostrou susceptível à infecção por *Le. amazonensis*. Por meio de técnicas moleculares, também foi detectado DNA de *Le. amazonensis* em *Lu. longipalpis* (Paiva et al., 2006; Savani et al., 2009), mostrando a permissividade desse flebotomíneo quanto a suscetibilidade à infecção por outras espécies de *Leishmania*.

O gênero *Psychodopygus* tem sido associado à transmissão de *Le. braziliensis* em Minas Gerais, sendo essa espécie *Ps. lloydi* encontrada com DNA de *Le. braziliensis* (Quaresma et al., 2012). Esta espécie de flebotomíneo também já foi encontrada infectada por *Le. infantum* em área de mata no estado de Minas Gerais (Lara-Silva et al., 2015). Em nosso trabalho a espécie *Ps. lloydi* foi detectada com DNA de *Leishmania* sp. e apresentou DNA de *Le. braziliensis*, sugerindo que este flebotomíneo poderia manter um ciclo silvestre da leishmaniose tegumentar naquela área de estudo. Em contrapartida, *Ps. lloydi* tem sido associada a abrigos de animais domésticos (galinha, porco) (Aguiar & Medeiros, 2003), uma condição presente no peridomicílio dos locais de coleta em Casa Branca, além de ser uma espécie capturada no peridomicílio de Casa Branca.

Os estudos sobre infecção natural em flebotomíneos estão na maioria das vezes concentrados na identificação de parasitas do gênero *Leishmania*, por ser agente etiológico das leishmanioses, doença de importância médica para o homem. Muitas vezes, estes estudos tem gerado direta ou indiretamente informações importantes a respeito dos parasitas tripanossomatídeos em flebotomíneos. Existem trabalhos que tem se concentrado na identificação de infecção natural por *Leishmania* associada a outros tripanossomatídeos, por meio de técnicas como dissecação e inoculação em cultura (Arias et al., 1985; Naiff et al., 1989; Freitas et al., 2002; Pinheiro et al., 2008).

Atualmente tem se observado a utilização de técnicas moleculares para a detecção de tripanossomatídeos como as técnicas de PCR, PCR-RFLP e sequenciamento genético, que tem auxiliado na identificação desses parasitas em flebotomíneos. A combinação das técnicas moleculares permite se chegar na maioria das vezes a nível específico do tripanossomatídeo. O uso da técnica de PCR dirigida ao minicírculo do kDNA demonstrou a presença de *Herpetomonas samuelpessoai* em *Pi. fischeri* no Espírito Santo (Rocha et al., 2010), e em estudo realizado no Distrito Federal utilizando diferentes marcadores moleculares

encontrou-se pela primeira vez *Ny. whitmani* com DNA do tripanossomatídeo do gênero *Blastocrithidia* sp., além de DNA de *Trypanosoma* sp. na espécie *Ev. evandroi* (Ferreira et al., 2015). O uso do alvo ITS1 permitiu a detecção de *Crithidia fasciculata* em flebotomíneos em área de Cerrado no estado de Minas Gerais (Saraiva et al., 2015). Apesar de esses achados demonstrarem a presença de DNA de tripanossomatídeos em flebotomíneos no Brasil, ainda são necessários mais estudos para esclarecer as associações dos flebotomíneos com as espécies de tripanossomatídeos.

A técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Hae* III não se mostrou uma boa ferramenta para diferenciar as espécies do gênero *Leishmania* de outros tripanossomatídeos detectados nos pools das fêmeas de flebotomíneos neste trabalho. Tal fato pode ser explicado pelo alvo molecular de escolha (ITS1) não ser possível distinguir em um mesmo pool espécies de *Leishmania* de outros tripanossomatídeos, gerando perfis de restrição sobrepostos que dificultaram a identificação das espécies, uma vez que a técnica de PCR-RFLP foi inicialmente descrita para gerar perfis de restrição para espécies do gênero *Leishmania* em amostras clínicas de pacientes (Schonian et al., 2003). Desse modo, a utilização desta técnica não obteve resultado satisfatório quando utilizada para caracterização de outros tripanossomatídeos (não-*Leishmania*) detectados em flebotomíneos neste trabalho. Apesar destas limitações, a amplificação da região intergênica ITS1 se apresenta como uma ferramenta dotada de grande sensibilidade e razoável especificidade, necessária principalmente para a detecção e caracterização dos isolados de *Leishmania* em flebotomíneos, haja vista que em muitos casos a carga parasitária nestes insetos pode ser um fator limitante para a detecção em caso da escolha de um alvo molecular menos sensível.

Um resultado similar foi encontrado por Rocha et al. (2010) utilizando outro alvo, o minicírculo do kDNA, em flebotomíneos detectados com DNA de tripanossomatídeos no Sudeste do Brasil, onde outros tripanossomatídeos apresentaram perfil similar ao de *Le. amazonensis* pela PCR-RFLP, também não sendo possível distingui-los através desta técnica.

Os flebotomíneos podem albergar outros parasitas além de protozoários do gênero *Leishmania* (Shaw et al., 2003), sendo assim, outro fator que deve ser levado em consideração é de que no presente trabalho foram utilizados pools contendo até 20 indivíduos na mesma amostra, portanto, seria possível ocorrer a infecção mista por mais de uma espécie de *Leishmania* ou outro tripanossomatídeo em um mesmo

pool, seja um flebotômíneo infectado por duas espécies de tripanossomatídeos ou detecção de mais de uma espécie de parasita no mesmo pool. A utilização de somente uma técnica para confirmação da espécie do parasita pode levar a interpretações equivocadas dos resultados ou até mesmo resultados inespecíficos. Por isso, a técnica do sequenciamento genético foi utilizada como método confirmatório para todos os pools detectados positivos para algum tipo de tripanossomatídeo (incluindo as leishmanias), já que somente a realização da técnica de PCR-RFLP não obteve resultado conclusivo em todos os pools.

O sequenciamento genético tem gerado bons resultados quando utilizado para detecção de *Leishmania* em flebotômíneos (Rêgo et al., 2015, Saraiva et al., 2015). A comparação da sequência de DNA de *Leishmania* obtida nos pools das fêmeas coletadas em Casa Branca com as sequências depositadas no banco de dados Genbank permitiu a identificação da espécie de *Leishmania* detectada, se mostrando uma boa técnica neste estudo. Em situações de infecção onde foram detectadas duas espécies de tripanossomatídeos no mesmo pool, o sequenciamento genético se mostrou a técnica mais adequada para se chegar mais próximo do resultado, sendo de fundamental importância para se conseguir distinguir as espécies do gênero *Leishmania*, *Crithidia*, *Endotrypanum* e *Herpetomonas* detectadas nos flebotômíneos neste trabalho.

As ferramentas moleculares também têm sido associadas com estudos filogenéticos, no qual tem auxiliado na classificação das espécies de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos (Fraga et al., 2010; Schonian et al., 2012; Marcili et al., 2014; Harkins et al., 2016). Neste estudo, a árvore gerada a partir dos dados moleculares obtidos através da PCR-ITS1, juntamente com o sequenciamento das amostras amplificadas possibilitou visualizar o grau de similaridade dos tripanossomatídeos detectados nos pools pela distância genética entre as bases das sequências de DNA analisadas, com os organismos cujas sequências do fragmento de DNA foi semelhante.

O ITS1 é uma região conservada do DNA ribossomal em *Leishmania* utilizado para detecção desse parasita pelas técnicas moleculares. Porém, é uma região comum a outros tripanossomatídeos, o que foi mostrado nesse estudo. Algumas limitações ocorreram no estudo, como baixas quantidades recuperadas de DNA do parasita e limitações quanto ao sequenciamento das amostras. Algumas sequências não obtiveram alta qualidade, como a amostra do Pool 73_400, a qual somente um sentido de leitura (Forward) foi recuperado, assim como a amostra Pool 73_300

(Reverse), sendo possível analisar somente um sentido da amostra. A qualidade dos eletroferogramas obtidos por sequenciamento genético pode ser um fator que explicaria, por exemplo, o agrupamento de alguns pools com mais de uma espécie de tripanossomatídeo na árvore filogenética, como o Pool 44_300 próximo de *Le. guyanensis* e *Leishmania* sp., e também o Pool 58_400 mais próximo de *Le. lainsoni* e *Le. naiffi* do que de *Endotrypanum monterogeii* (EL). Assim, o resultado final depende da qualidade da amostra, juntamente com as técnicas de biologia molecular (extração, PCR, sequenciamento e análises filogenéticas). Apesar dessas limitações, nossos resultados são interessantes por identificar outras espécies de tripanossomatídeos além das leishmanias em flebotomíneos.

A árvore obtida no presente estudo mostra que os seis pools detectados com *Endotrypanum* sp. estão agrupadas no mesmo clado que *Le. naiffi* e *Le. lainsoni*, onde a relação de semelhança entre os pools e *Endotrypanum* sp. é evidente nessa árvore. O tamanho do fragmento de pares de bases obtido para esses pools (400-500 pb), juntamente com o perfil gerado do fragmento no gel de eletroforese permite inferir que esses cinco pools detectados sejam do gênero *Endotrypanum*. Porém, chama-se atenção à posição destas espécies de *Leishmania* (*Le. naiffi* e *Le. lainsoni*) do subgênero *Viannia* estarem mais próximas – no mesmo clado – da espécie de *Endotrypanum monterogeii* (EL) do que do restante das outras amostras de leishmânias (subgênero *Leishmania*). Uma revisão taxonômica recente revelou que algumas espécies de *Leishmania* pertencem ao gênero *Endotrypanum* (*Le. herreri*, *Le. equatoriensis* e *Le. colombiensis*) (Espinosa et al., 2016), demonstrando a dificuldade e complexidade do estudo de tripanossomatídeos. Como não utilizamos todas as sequências de ITS1 disponíveis no GenBank e o fragmento de ITS1 é muito conservado e muito curto, não é possível fazer inferências filogenéticas, apenas usamos a árvore para indicar a similaridade entre as nossas sequências e as sequências obtidas pelo BLAST.

O resultado obtido nesse estudo chama a atenção para o encontro de *Endotrypanum* sp. detectado em seis pools da espécie de flebotomíneos *Ny. whitmani* em Casa Branca. O gênero *Endotrypanum* compreende parasitas encontrados em mamíferos que tem como principal hospedeiro as preguiças do gênero *Choloepus* na região Neotropical (Cunha & Muniz, 1944; Franco & Grimaldi Jr, 1999) e tem como hospedeiros invertebrados os flebotomíneos (Shaw, 1969; Shaw et al., 2003). Estudos realizados por Christensen & Herrer (1976, 1979) mostraram a infecção experimental de flebotomíneos na região Neotropical por

Endotrypanum a partir de preguiças infectadas, evidenciando a susceptibilidade dos flebotomíneos em se infectarem por esse gênero de tripanossomatídeo. Como já mencionado, Casa Branca está inserida às margens do Parque Estadual Serra do Rola Moça, área de mata que poderia abrigar preguiças por se tratar de uma unidade de conservação que possui vegetação de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, habitat desse hospedeiro. Por outro lado, outras espécies de mamíferos podem estar envolvidas como reservatórios desse tripanossomatídeo na área de estudo, necessitando de maior investigação a respeito do assunto. A presença deste tripanossomatídeo no local de estudo sugere a possível participação de *Ny. whitmani* na dispersão deste parasito entre os hospedeiros naturais. Desta forma, é importante enfatizar a correta caracterização dos tripanossomatídeos para estudos epidemiológicos de reservatórios e vetores flebotomíneos em áreas endêmicas.

6.3 Identificação de fontes alimentares sanguíneas de fêmeas de flebotomíneos

Muitos estudos demonstram o sucesso de técnicas moleculares para identificar fontes alimentares em flebotomíneos. Porém, para o sucesso da técnica existem passos importantes que devem ser levados em consideração que foram percebidos neste estudo: primeiro, a técnica permite que espécimes alimentadas coletadas no campo possam ser preservados a seco e armazenados por longos períodos de tempo até o momento de serem testadas. No entanto, precauções como garantir que o processo de extração de DNA nas fêmeas alimentadas seja estritamente livre de contaminação é um ponto crucial, uma vez que foi utilizado um primer universal com capacidade de identificar diversas espécies de vertebrados (gene *Cyt b*).

Em nosso estudo, a ausência de amplificação em todos os controles negativos internos sugere a ausência de potenciais contaminantes de uma fonte externa, como no laboratório ou no campo. Por isso, é de fundamental importância incluir um controle interno em todos os procedimentos de extração de DNA (como machos de flebotomíneos ou fêmeas conhecidas como não ingurgitadas) como medida de avaliação para possível contaminação.

Foi obtida uma porcentagem de 192 (53%) fêmeas ingurgitadas e identificadas a nível de espécie. Um ponto importante, que pode explicar a identificação de pouco

mais da metade das fêmeas testadas para fontes alimentares, levando em consideração o número total de amostras utilizadas neste estudo (362/100%) e o número total identificado (192/53%), pode ser o volume de sangue ingerido por essas fêmeas e o tempo decorrido após a conclusão do repasto, como sugerido por Sant'Anna et al. (2008), Maleki-Ravasan et al. (2009), Quaresma et al. (2012) e Valinsky et al. (2014). A técnica funcionou satisfatoriamente para as fêmeas com sinais de ingurgitamento forte, pois pode haver fêmeas que foram destinadas à pesquisa de fonte alimentar que estavam com ovos e/ou pouca quantidade de sangue em seu abdômen, o qual adquire uma coloração escura assemelhando-se a sangue, e dessa forma foi separada na triagem como fêmea alimentada com sangue. Estes dados podem ser justificados a partir do grande número de amostras negativas para a PCR *Cyt b* (47%), possivelmente devido à baixa quantidade de DNA extraído do hospedeiro vertebrado.

Foi demonstrado por Sant'Anna et al. (2008) que, devido ao processo de digestão do sangue inerente a qualquer inseto hematófago, apenas os recentemente ingurgitados poderiam ser usados para a análise. Os flebotomíneos ingerem pouquíssima quantidade de sangue (Rogers et al., 2002) e o DNA do hospedeiro pode ser insuficiente, especialmente em flebotomíneos capturados alimentados parcialmente.

Em relação ao sequenciamento das amostras amplificadas, foram consideradas as sequências que mostraram mais de 96% de identidade cobrindo pelo menos 95% da sequência analisada comparando com as amostras depositadas no banco de dados do GenBank. Definir um ponto de corte de similaridade que funcione em todas as espécies é delicado uma vez que a quantidade de divergência intraespecífica da sequência de DNAm_t pode variar entre diferentes grupos de organismos (Funk & Omland, 2003; Will & Rubinoff, 2004), portanto, foram considerados esses valores para o pontos de corte.

Vários estudos têm sido realizados utilizando o gene *Cyt b* como alvo para a detecção de fontes de alimento em flebotomíneos, apresentando taxas variáveis na identificação de vertebrados (Abbasi et al., 2009; Quaresma et al., 2012 Soares et al., 2014). Em nosso estudo, o uso da técnica molecular permitiu a identificação da fonte alimentar em 53% das fêmeas consideradas ingurgitadas. Estes resultados nos mostram que a técnica foi satisfatória, uma vez que todas as identificações de vertebrados foram coerentes com os pontos de coleta de flebotomíneos (exposição de armadilhas) na localidade de estudo. Como já mencionado, as residências de

exposição das armadilhas em Casa Branca apresentavam pelo menos uma criação de animal doméstico, como cão, galinha, porco, e além disso, a proximidade dessas criações de animais à residência do morador pode atrair flebotomíneos até mesmo para dentro das residências, o que pode justificar a porcentagem de fêmeas que foram detectadas com sangue humano. Porém, uma vantagem desta técnica é que a identificação das espécies fontes de alimento para flebotomíneos não depende de conhecimento prévio das possíveis fontes alimentares na área de estudo.

A maior parte das fêmeas analisadas alimentou em *Gallus galus*, seguido de *Canis familiaris*, *Homo sapiens* e *Rattus rattus*. A criação de animais domésticos é uma condição presente na maioria das residências onde foram expostas as armadilhas no peridomicílio em Casa Branca, sendo a criação de galinha a mais comum. A presença de galinhas neste ambiente peridomiciliar pode ajudar a manter o ciclo de transmissão de *Leishmania*, uma vez que esse ambiente pode funcionar como um criadouro de flebotomíneos com oferta de alimento e abrigo. Além disso, a presença de galinheiros próximos às habitações humanas, que é característica das residências mais precárias no meio urbano, juntamente com uma área onde foram notificados casos de LV, situação que ocorre em Casa Branca, pode oferecer maior risco de ocorrência e manutenção do ciclo da LV (Alexander et al., 2002).

A espécie *Ny. whitmani* apresentou o maior número de fêmeas alimentadas capturadas (199/362). Neste estudo, *Ny. whitmani* também foi a espécie mais abundante capturada no peridomicílio, evidenciando que esta espécie está sendo capturada em grande densidade próxima às habitações humanas como mostrado em outros trabalhos em Minas Gerais (Saraiva et al., 2011; Souza et al., 2014), mostrando ser uma espécie com grau de adaptação a ambientes peridomiciliares.

Nyssomyia whitmani foi também a espécie com maior sucesso na identificação de sangue ingerido (84/199 – 43,8%). A fonte alimentar *Gallus gallus* foi a fonte com maior identificação em *Ny. whitmani*, mostrando neste estudo que galinha é uma fonte alimentar bastante procurada por esta espécie de flebotomíneo, além de poder ajudar a manter estes flebotomíneos neste ambiente peridomiciliar.

A espécie *Lu. longipalpis* foi a segunda espécie mais abundante capturada ingurgitada no peridomicílio, apresentando a segunda maior taxa de identificação da fonte alimentar, juntamente com *Mg. migonei*. Sabemos que *Lu. longipalpis* é considerada a principal espécie vetora de *Le. infantum* no Brasil (Lainson & Rangel, 2005), e esta espécie parece ter um comportamento alimentar bastante eclético, sendo identificada neste estudo com as seguintes fontes alimentares: homem, cão e

galinha. Assim, muitas vezes a criação de animais pode apresentar um risco de transmissão nestes ambientes, uma vez que as espécies vetoras podem ser atraídas por estes animais podendo ainda alimentar-se em seres humanos, que foi a principal fonte alimentar de *Lu. longipalpis* em nosso estudo.

Lutzomyia longipalpis é uma espécie de flebotomíneo que se alimenta facilmente em galinhas (Barata et al., 2005; Missawa et al., 2008; Tanure et al., 2015) podendo ser coletada em grande quantidade próxima a galinheiros (Genaro et al., 1990). Vários estudos epidemiológicos sugerem que a proximidade com galinhas é um fator de risco para a aquisição de LV humana e canina (Corredor et al., 1989; Castellón & Domingos 1990; Arias et al., 1996; Caldas et al., 2002; Moreira et al., 2003), sustentando uma grande população de vetores no peridomicílio.

Vale ressaltar que a região teve um estudo recente sobre a prevalência de leishmaniose visceral canina, avaliando 1.413 cães e destes, 60 foram soro reativos, determinando uma prevalência sorológica de 4,2% (Pereira 2016). Este é outro dado que reforça a importância epidemiológica que a criação do cão desempenha no meio urbano, uma vez que o cão é um importante elo de ligação entre *Le. infantum* e humanos, especialmente pela ocorrência de um grande número de cães infectados e grande parasitismo da pele que ocorre nestes animais (Lima et al., 2004; Monteiro et al., 2005; Prado et al., 2011). Isso se torna ainda mais evidente quando se observa que os casos humanos geralmente ocorrem em locais com alta prevalência de LV canina, o que reforça a hipótese de que a infecção de LV em humanos geralmente tem uma dependência espacial da leishmaniose visceral canina (Teixeira-Neto et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que três espécies de flebotomíneos se alimentaram em cães: *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Ny. whitmani*. Todas estas espécies apresentam importância epidemiológica, associadas à transmissão de espécies de *Leishmania*, chamando a atenção para *Lu. longipalpis* principal espécie vetora de *Le. infantum* no Brasil (Lainson & Rangel 2005), *Mg. migonei* identificado como vetor potencial por alguns autores (Carvalho et al., 2010, Salomón et al., 2010, Guimarães et al., 2016) e também *Ny. whitmani* considerada como uma das principais espécies vetoras de *Le. braziliensis* no Brasil (Ryan et al., 1990; Azevedo & Rangel 1991; Miranda et al., 2002; Paiva et al., 2010), porém esta espécie também já foi encontrada com DNA de *Le. infantum* em Minas Gerais (Saraiva et al., 2010; Margonari et al., 2010). Esses achados evidenciam novamente o papel do cão na manutenção do ciclo da LV, convivendo próximos ao seres humanos e servindo

como fonte alimentar para estas três espécies de flebotomíneos de importância médica.

A espécie *Rattus rattus* foi identificada como fonte alimentar em dois exemplares da espécie *Mg. migonei*. Esta espécie de roedor é comum ao ambiente urbano, encontrada próxima ao peridomicílio das residências, associada à presença de material acumulado em quintais (entulho), condição presente no peridomicílio de algumas residências de coleta de flebotomíneos de Casa Brana. Assim, a presença deste roedor no peridomicílio pode ser fonte de alimento para fêmeas de flebotomíneos, como mostrado neste estudo. Apesar disso, seu papel como reservatório de *Leishmania* ainda é pouco estudado, porém, esta espécie foi encontrada no peridomicílio da área de estudo Casa Branca onde foi detectado DNA das espécies *Le. braziliensis* e *Le. infantum* (Pereira, 2015).

7 CONCLUSÕES

- A fauna de flebotomíneos de Casa Branca, pertencente ao município de Brumadinho, Minas Gerais, foi composta de 23 espécies pertencentes a oito gêneros.
- A espécie mais abundante coletada no peridomicílio foi *Ny. whitmani*, seguida por *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei*.
- Foram encontradas espécies de importância médica como *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis*, importantes vetores de LTA e LV no sudeste do Brasil.
- As variáveis climáticas (temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar) medidas não obtiveram correlação significativa com os flebotomíneos coletados em Casa Branca.
- A espécie *Ny. whitmani* detectada com DNA de *Le. braziliensis* e capturada em maior abundância na área de estudo sugere que esta espécie esteja participando do ciclo de transmissão da LTA em Casa Branca.
- O DNA de *Le. amazonensis* detectado em *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* indica que esta espécie de *Leishmania* está circulando entre reservatórios e vetores na região.
- O encontro de *Ps. lloydi* com DNA de *Le. braziliensis* corrobora com achados de que esta espécie poderia estar participando do ciclo de transmissão silvestre da LTA na área de estudo.
- Foi possível detectar DNA de *Crithidia* sp., *Herpetomonas* sp. e *Endotrypanum* sp. nos pools das fêmeas de flebotomíneos através da técnica de PCR-ITS1, com confirmação pela técnica de sequenciamento genético.
- A técnica de sequenciamento genético associada à ferramenta de construção da árvore pelo método Neighbor-joining possibilitou o agrupamento dos pools com as sequências referência mais semelhantes do banco de dados.
- Foi possível identificar o sangue ingerido em sete espécies de fêmeas de flebotomíneos através da utilização da técnica do citocromo b.
- *Gallus gallus* foi a fonte alimentar mais comum entre as espécies de flebotomíneos alimentadas.
- *Rattus rattus* foi identificada como fonte alimentar em 2 indivíduos, mostrando a presença desses roedores no peridomicílio podendo funcionar como possíveis hospedeiros e/ou reservatórios no local.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. Identification of Blood Meals Imbided by Phlebotomine Sand Flies Using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**; v. 9, n. 1, p. 79-86, 2009.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 207-255.
- ALEXANDER, B. et al. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**; v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**; v. 88, p. 543-549, 1994.
- ALMEIDA, P. S. et al. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletados em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**; v. 54, p. 304-310, 2010.
- ANDRADE FILHO, J. D. et al. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Cadernos de Saúde Pública**; v. 13, p. 767-770, 2001.
- ANDRADE FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 481-487, 2007.
- ANDRADE, A. J.; GURGEL-GONÇALVES, R. New record and update on the geographical distribution of *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America. **Check List**; v. 11, p. 1566, 2015.
- ARIAS, J. R. et al. Flagellate infections of brazilian sand flies (diptera: psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; v. 34, n. 6, p. 1098-1108, 1985.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**; v. 2, p. 145-156, 1996.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F. 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**; v. 86, n. 4, p. 405-410, 1991.

AZIZI, K. et al. Molecular detection of *Leishmania* parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new endemic rural region, south of Iran. **Pathogens and Global Health**; v. 110, p. 303-309, 2016.

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**, v. 38, p. 421-425, 2005.

BARATA, R. A. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 44, p. 136-139, 2011.

BARRETO, M. P. **Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1943.

BLACKWELL, A.; BROWN, N.; MORDUE, W. The use of the enhanced ELISA method for the identification of Culicoides bloodmeal in host-preference studies. **Medical and Veterinary Entomology**; v. 9, n. 2, p. 214-218, 1995.

BOSSENO, M. F. et al. Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 74, n. 2, p. 303-305, 2006.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology Today**; v. 10, p. 329-330, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, MS, 2007. 182p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, MS, 2014. 814 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos do Brasil. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 257-274.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**; v. 4, p. 144, 2015.

BRAZIL, R. P.; MORTON, I. E.; WARD, R. D. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Ceará state, Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 86: 497-498, 1991.

CALDAS, A. J. M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 96, p. 21-28, 2002.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; DE GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 35, p. 299-306, 2002.

CARVALHO, G. M. L. et al. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. **Vector-Borne Zoonotic Dis.**; v. 8, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, G. M. L. et al. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 47, p. 972-976, 2010.

- 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**; v. 116, p. 108-110, 2010.
- CASTELLÓN, E. G.; DOMINGOS, E. D. On the focus of kala-azar in the state of Roraima, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 86, n. 3, p. 375, 1990.
- CHANIOTIS, B. N. et al. Natural populations dynamics of phlebotomine sandflies in Panamá. **Journal Medical Entomology**; v. 8, p. 339-352, 1971.
- CHOW, E.; WIRTS, R. A.; SCOT, T. W. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of the American Mosquito Control Association**; v. 9, n. 2, p. 196-205, 1993.
- CHRISTENSEN, H. A.; HERRER, A. Neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae), invertebrate hosts of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal Medical Entomology**; v. 13, p. 299-303, 1976.
- CHRISTENSEN, H. A.; HERRER, A. Susceptibility of sandflies (Diptera: Psychodidae), to Trypanosomatidae from two-toed sloths (Edentata: Bradypodidae). **Journal Medical Entomology**; v. 16, p. 424-427, 1979.
- COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; PRADO, Â. P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 105, p. 208-215, 2010.
- CORREDOR, A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 40, p. 480-486, 1989.
- COSTA, S. M. et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes&Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 149-153, 2007.
- COULSON, R. M. et al. Amplifications and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. **Medical Veterinary Entomology**; v. 4, p. 357-366, 1990.

CUNHA, A. M.; MUNIZ, J. Pesquisas sobre *Endotrypanum schaudini*, Mesnil & Brimont, 1908, parasita do *Choloepus didactylus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 41, p. 179-198, 1944.

Deane, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956.

Deane, L. M.; Deane, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**; v. 4, p. 149-212, 1962.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**; v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 40; p. 49-52, 2007.

DIAS, E. S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**; v. 176, p. 101-111, 2011.

DIAS-LIMA, A. G.; CASTÉLLON, E. G.; SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**; v. 33, p. 303-316, 2003.

DWEIK, A. et al. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and Hae III) for the detection of leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. **Ann. Trop. Medical Parasitology**; v. 101, p. 399-407, 2007.

EDRISSIAN, G. H.; HAFIZI, A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of Anopheles mosquito bloodmeals. **Trans. R. Soc. Trop. Medical Hygiene**; v. 76, p. 54-56, 1982.

El Tai, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Trans. Roy. Soc. Trop. Medical Hygiene**; v. 94, p. 575-579, 2000.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**; v. 15, p. 1-13, 2016.

FERREIRA, F. S. C. A reação das precipitinas aplicadas aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. **Anais do Instituto de Medicina Tropical**; v. 2, p. 187-196, 1945.

FERREIRA, T. S. et al. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomines and flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 48, p. 776-779, 2015.

FONTELES, R. S. et al. Experimental Infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*, Etiological Agents of American Tegumentary Leishmaniasis. **Journal Medical Entomology**; v. 53, n. 1, p. 206-209, 2016.

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera:Psychodidae). **Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo**. v. 25, p. 209-215, 1960.

FORATTINI, O. P. et al. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**; v. 6, p. 431-433, 1972.

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

FORATTINI OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**; v. 10; p. 31-43, 1976.

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

FRANCO, A. M. R.; GRIMALDI Jr, G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a Unique Parasite Infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 94, p. 261-268, 1999.

- FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**; v. 10, p. 238-245, 2010.
- FREITAS, R. A.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V. Species diversity and flagellate infections in the sandfly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 97, p. 53-59, 2002.
- FREITAS, T. P. T. et al. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* Captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.**; v. 12, p. 81-83, 2012.
- FREITAS-LIDANI, K. C.; MESSIAS-REASON, I. J.; ISHIKAWA, E. A. Y. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 109, p. 442-447, 2014.
- FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA Insights from Animal Mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**; v. 34, p. 397-423, 2003.
- GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 23-51.
- GALATI E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 53-175.
- GENARO, O. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 23, p. 121, 1990.
- GOMES, L. A. et al. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* and *Aedes fluviatis* mosquitos experimentally fed on feline, canine and human hosts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 96: 693-695, 2001.
- GONTIJO, C. M. F. et al. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 90, n. 3, 1995.

- GONTIJO, C. M. F. et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**; v. 81, p. 143-150, 2002.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 36, p. 71-80, 2003.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v. 7, p. 338-349, 2004.
- GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 107, p. 664-674, 2012.
- GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 22, p. 2319-2327, 2006.
- GUERRA J. A. O. et al. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**; v. 37, p. 133-138, 2007.
- GUIMARÃES, C. F. V. et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; v. 56, p. 357-360, 2014.
- GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**; v. 9, p. 159, 2016.
- HAOUAS, N. et al. Development of a molecular tool for identification of *Leishmania* reservoir host by blood meal analysis in the vector. **A. M. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 77, p. 1054-1059, 2007.
- HARKINS, K. M. et al. Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. **Infection, Genetics and Evolution**; v. 38, p. 101-109, 2016.

HARRIS, E. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal Clinical Microbiology**; v. 36, p. 1989-1995, 1998.

HAYEK, L. A. C.; BUZAS, M. A. Surveying Natural Populations. New York, Columbia University Press; 347-389, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativa da População 2016, Brumadinho, Minas Gerais, Brasil. Disponível em <http://www.cidades.ibge.gov.br>; 2015.

Acessado em 10 de dezembro de 2016.

IEF. Instituto Estadual de Florestas. Parque Estadual Serra do Rola Moça. Disponível em: <http://www.ief.mg.gov.br/component/content>; 2016.

Acessado em 02 de dezembro de 2016.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Automática de Ibirité, 2015. **Dados sobre Temperatura, Precipitação e Umidade Relativa do Ar.**

IRWIN, D. M.; COCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal Molecular and Evolution**; v. 32, p. 128-144, 1991.

KENT, R.; NORRIS, D. E. Identification of Mammalian blood meal in mosquitos by a multiplex by Polimerase Chain Reaction target cytochrome B. **Am. J. Medicine and Hygiene**; 73: 336-342, 2005.

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

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology Evolution**; v. 33, p. 1870-1874, 2016.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis with particular reference to Brazil - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 100, p. 811-827, 2005.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W, KILLICK-KENDRICK R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine** 1987. p. 1- 120.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Org.). **Biology of the Kinetoplastida**. London and New York: Academic Press, 1979. p. 1-116.
- LANGERON, M. **Précis de microscopie**. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris 1949.
- LARA-SILVA, F. O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**; v. 148, p. 128-136, 2015.
- LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**; v. 92, p. 43-53, 2004.
- LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 581-585, 2007.
- LUZ, Z. M. P. et al. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 34, p. 249-254, 2001.
- MACEDO, I. T. F. et al. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**; v. 18, p. 67-74, 2008.
- MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal Medical Entomology**; v. 51, p. 237-244, 2014.
- MACHADO, T. O. et al. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquaruçú, state of Tocantins, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 107, p. 955-959, 2012.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 24, p. 2941-2947, 2008.

- MALEKI-RAVASAN, N. et al. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. **Iranian Journal of Arthropod - Borne Diseases**; v. 3, n. 1, p. 8-18, 2009.
- MARCELINO, A. P. et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**; v. 183, p. 54-58, 2011.
- MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**; v. 25, p. 44-51, 2014.
- MARGONARI, C. et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 47, p. 1212-1219, 2010.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**; v. 16, p. 188-189, 2000.
- MAYRINK, W. et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**; v. 73, p. 123-137, 1979.
- MICHAEL, E. et al. Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 65, p. 722-778, 2001.
- MICHALSKY, E. M. et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 104, p. 56-61, 2009.
- MILES, M. A. et al. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 32, p. 1251-1259, 1983.
- 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 97, p. 185-188, 2002.

- MISCEVIC, Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. **Acta Veterinary**; v. 31, p. 32-39, 1981.
- 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. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 41, p. 365-368, 2008.
- MOLAEI, G. et al. Host feeding patterns of potencial mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquilletidia*, *Psorofhora* and *Urotaenia*. **Journal Medical Entomology**; v. 6, p. 1143-1151, 2008.
- MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 38, p. 147-152, 2005.
- MOREIRA, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; v. 69, p. 393-397, 2003.
- MOSCHIN, J. C. et al. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. **Rev. Brasileira de Epidemiologia**; v. 16, p. 190-201, 2013.
- NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; FREITAS, R. A. Isolation of *Trypanosoma freitasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Psychodopygus claustreri* (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 84, p. 273-275, 1989.
- NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; v. 56, p. 391-395, 2014.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos Saúde Pública**; v. 19, p. 933-944, 2003.
- PAIVA, B. R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**; v. 99, p. 252-259, 2006.

PAIVA, B. R. et al. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 23, p. 87-94, 2007.

PAIVA, B. R. et al. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**; v. 115, p. 126-130, 2010.

PASSOS, V. M. A. et al. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 34, p. 5-12, 2001.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal Parasitology**; v. 8, p. 972-978, 2002.

PEREIRA, A. A. S. **Avaliação da infecção por *Leishmania spp.* em pequenos mamíferos de áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2015.

PEREIRA, D. C. A. **Aspectos epidemiológicos da transmissão de leishmaniose visceral canina no município de Brumadinho – Minas Gerais.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, 2016.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. **Leishmaniose Tegumentar Americana.** 1948. Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo, São Paulo, 1948.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**; v. 33, p. 919-931, 2003.

PINHEIRO, F. G.; LUZ, S. L. B.; FRANCO, A. M. R. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**; v. 38, p. 165-172, 2008.

- PITA-PEREIRA, D de. et al. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil. **Acta Tropica**; v. 120, p. 273-275, 2011.
- PIZARRO, J. C.; LUCERO, D.; STEVENS, L. A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. **Kinetoplastid Biology Disease**; v. 6, p. 1, 2007.
- PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev. Soc. Bras Medicina Tropical**; v. 44, p. 561-566, 2011.
- PUGEDO, H. et al. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. **Rev. Soc. Bras Medicina Tropical**; v. 38, p. 70-72, 2005.
- QUARESMA, P. F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans. Royal. Soc. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 105, p. 579-585, 2011.
- QUARESMA, P. F. et al. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 107, p. 480-485, 2012.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar Americana. In RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 291-310.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 104, p. 937-954, 2009.
- RÊGO, F. D. et al. Molecular detection of *Leishmania* in Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS One**; v. 10, p. 1-14, 2015.
- REIS, S. R. **Diagnóstico biológico e molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana em cães domésticos (*Canis familiaris*) no município de Manaus,**

- AM, BR. 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2008.
- ROBERTS, D. R.; HIS, B. P. An Index of Species Abundance for Use with Mosquito Surveillance Data. **Environmental Entomology**; v. 8, n. 6, p. 1007-1013, 1979.
- ROCHA, L. S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 104, p. 461-466, 2010.
- ROCHA, L. S.; SANTOS, C. B.; FALQUETO, A. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sandflies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitology Research**; v. 107, p. 465-468, 2010.
- RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal Clinical Microbiology**; v. 9, p. 2246-2252, 1994.
- ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**; v. 124, p. 495-507, 2002.
- ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America – a systematic review. **Plos Neglected Tropical Disease**; v. 4, n. 1; p. 1-17, 2010.
- RYAN, L. et al. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. **Trans. Roy. Soc. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 84, p. 789, 1990.
- SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplifications of DNA with a thermostable DNA Polymerase. **Science, New Series**; v. 239, p. 487-491, 1988.
- SALES, K. G. S. et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. **Parasites & Vectors**; v. 8, p. 1-6, 2015.
- SALOMÓN, et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**; v. 113, p. 84-87, 2010.
- SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 110, p. 831-846, 2015.

- SANT'ANNA, M. R. V. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**; v. 107, p. 230-237, 2008.
- SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**; v. 12, p. 315-317, 1998.
- SARAIVA, L. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) and *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Minas Gerais, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 46, p. 1159-1163, 2009.
- SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 105, p. 1033-1039, 2010.
- SARAIVA, L. et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favoured locations as determined by spatial analysis. **Acta Tropica**; v. 117, p. 137-145., 2011.
- SARAIVA, L. et al. Survey of sand flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil. **Plos One**; v. 10, p. 1-5, 2015.
- SAVANI, E. S. M. et al. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**; v. 160, p. 18-24, 2009.
- SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**; 2003; v. 47, p. 349-358, 2003.
- SCHONIAN, G.; CUPOLILLO, C.; MAURICIO, I. Molecular Evolution and Phylogeny of *Leishmania*. **Drug Resistance in Leishmania Parasites**; v. 1, p. 15-44, 2012.
- SMS Brumadinho. Secretaria Municipal de Saúde de Brumadinho (SMS - Brumadinho/MG). 2016. **Dados de casos autóctones de leishmanioses fornecidos de 2007 a 2015.**

- SHAW, J. J. **The hemoflagellates of sloths**. In London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, 1969. p. 132.
- SHAW, J. et al. Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 337-351.
- SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V. A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**; v. 32, p. 209-217, 1972.
- SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**; v. 11, 2011.
- SILVA, O. S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 94, p. 579-582, 1999.
- SILVEIRA, F. T. et al. Cutaneous leishmaniasis in Amazonian: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) in the state of Pará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; v. 33, p. 18-22, 1991.
- SOARES, V. Y. R. et al. Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome b gene. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 109, p. 379-83, 2014.
- SOUZA, N. A. et al. 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**; v. 97, p. 759-765, 2002.
- SOUZA, C. M. et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 99, p. 795-803, 2004.
- SOUZA, C. F. et al. Phlebotomine fauna in the urban area of Timóteo, State of Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**; v. 134, p. 72-79, 2014.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**; v. 97, p. 247-254, 2005.

STUCKY, B. J. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**; v. 23, p. 90-93, 2012.

TANURE, A. et al. Identification of sandflies (diptera: psychodidae: phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; v. 57, p. 321-324, 2015.

TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**; v. 7, p. 1-14, 2014.

TELES, C. B. G. et al. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 111, p. 423-432, 2016.

TESH, R. B.; MODI, G. B. A simple method for experimental infection of phlebotomine sandflies with *Leishmania*. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 33, p. 41-46, 1984.

THIES, S. F. et al. Phlebotomine sandfly fauna and natural *Leishmania* infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 46, p. 293-298, 2013.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**; v. 7, p. 4-8, 2017.

VALINSKY, L. et al. Molecular Identification of Bloodmeals From Sand Flies and Mosquitoes Collected in Israel. **Journal Medical Entomology**; v. 51, p. 678-685, 2014.

VIRGENS, T. M. das. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 24, p. 2969-2978, 2008.

WARD, R. D. Vector biology and control. In CHANG K. P.; BRAY, R (Org.). **Leishmaniasis**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: New York & Oxford 1985. p. 199-212.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Global Health Observatory data**.

Disponível em: www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ 2015;

Acessado em 15 de dezembro de 2016.

WILL, K. W.; RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**; v. 20, p. 47-55, 2004.

APÊNDICES

Carta de aceite do artigo "Blood Meal Identification in Field-collected Sand Flies from Casa Branca, Brazil using the cytochrome b PCR method"

De: onbehalfof+davidLutzomyiaflorin+gmail.com@manuscriptcentral.com

[onbehalfof+davidLutzomyiaflorin+gmail.com@manuscriptcentral.com]

Enviado: segunda-feira, 30 de janeiro de 2017 17:15

Para: José Dilermando Andrade Filho - Fiocruz

Assunto: Journal of Medical Entomology - Decision on Manuscript ID JME-2016-0328.R3

30-Jan-2017

Dear Miss Andrade-Filho,

It is a pleasure to accept your revised manuscript entitled "Blood Meal Identification in Field-collected Sand Flies from Casa Branca, Brazil using the cytochrome b PCR method" in its current form for publication in the Journal of Medical Entomology.

Having your manuscript accepted means that the editor, subject editor, and at least two other colleagues reviewed your paper. We hope that if you are asked to review another author's manuscript that you will choose to do so in order to return the favor and provide a vital service to the journal and to your profession.

You will receive your official acceptance date from Oxford University Press once you have signed your licence to publish, which you will receive in a separate email from Oxford. This is the acceptance date that will be published with your paper. (N.B. If you are a UK-based author and are looking to comply with the HEFCE policy on open access in the Research Excellence Framework, you should use the official acceptance date when depositing in your repository.)

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Medical Entomology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. David Florin

Editor, Journal of Medical Entomology

davidLutzomyiaflorin@gmail.com

Journal: Journal of Medical Entomology

DOI: 10.1093/jme/tx051

Title: Blood Meal Identification in Field-collected Sand Flies from Casa Branca, Brazil using the cytochrome b PCR method

Standard Licence

You hereby grant to

Oxford University Press

an exclusive licence for the full period of copyright throughout the world:

- to publish the final version of the Article in the above Journal, and to distribute it and/or to communicate it to the public, either within the Journal, on its own, or with other related material throughout the world, in printed, electronic or any other format or medium whether now known or hereafter devised;
- to make translations and abstracts of the Article and to distribute them to the public;
- to authorize or grant licences to third parties to do any of the above;
- to deposit copies of the Article in online archives maintained by OUP or by third parties authorized by OUP.

You authorize us to act on your behalf to defend the copyright in the Article if anyone should infringe it and to register the copyright of the Article in the US and other countries, if necessary.

In the case of a multi authored article, you confirm that you are authorized by your co-authors to enter the licence on their behalf.

You confirm to OUP that the Article

- is your original work;
- has not previously been published (in print or electronic format), is not currently under consideration by another journal, or if it has already been submitted to other journal, it will be immediately withdrawn;
- will not be submitted for publication to any other journal following acceptance in the above Journal; and
- OUP will be the first publisher of the Article.

You warrant to OUP that

- no part of the Article is copied from any other work;
- you have obtained ALL the permissions required (for print and electronic use) for any material you have used from other copyrighted publications in the Article; and
- you have exercised reasonable care to ensure that the Article is accurate and does not contain anything which is libellous, or obscene, or infringes on anyone's copyright, right of privacy, or other rights.

Further Information

(Full details of OUP's publication rights policies, including author rights can be found at <http://www.oxfordjournals.org/en/access-purchase/rights-and-permissions/publication-rights.html>)

Author Self-Archiving Policy

On publication of your Article in the Journal you are not required to remove any previously posted ORIGINAL VERSIONS from your own personal website or that of your employer or free public servers of articles in your subject area, provided (1) you include a link (url) to the VERSION OF RECORD on the Journal's website; AND (2) the Journal is attributed as the original place of publication with the correct citation details given.

You may post the ACCEPTED MANUSCRIPT of the Article (but not the published version itself) onto your own website, your institution's website and in institutional or subject-based repositories, PROVIDED THAT it is not made publicly available until 12 MONTHS after the online date of publication, and that: (1) you include a link (url) to the VERSION OF RECORD on the Journal's website; (2) the Journal is attributed as the original place of publication with the correct citation details given.

Notes

Author's Original Version (AOV): an unrefereed manuscript version of the article, as submitted for review by a journal

Accepted Manuscript (AM): the final draft author manuscript, as accepted for publication by a journal, including modifications based on referees' suggestions but before it has undergone copyediting and proof correction

Version of Record (VOR): the final published version of the article.

Free Link to Published Article

On publication, authors will be sent an online offprint link allowing access to their article on the OUP website without subscription. For authors of non- Open Access articles, this link may be shared directly with interested colleagues, but is not intended for mass distribution on websites, repositories, or through social media. If you wish to share links or draw attention to your article we would ask that you instead distribute a link to the abstract of the article. Authors of Open Access articles are free to post and distribute their links anywhere immediately upon publication.


Educational Use

You may use the Article within your employer's institution or company for educational or research purposes only, including use in course-packs, as long as: (1) you do not use it for commercial purposes or re-distribution outside of the institution/company; (2) you acknowledge the Journal as the original place of publication with the correct citation details given.


Josse Dilermando Andrade Filho signed this licence on 2017-01-31 12:51:37 GMT.

Outras publicações

de Castilho Sanguinette et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:428
DOI 10.1186/s13071-015-1003-2



RESEARCH **Open Access**



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

Cristiani de Castilho Sanguinette¹, Danyele Franca da Silva¹, Rodolfo German Antonelli Vidal Stumpp², Felipe Dutra Rego¹, Gabriel Barbosa Tonelli¹, Aline Tanure¹, Célia Maria Ferreira Gontijo¹ and José Dilermando Andrade Filho^{1*}

Abstract

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

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

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

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


Keywords: Phlebotominae, Fauna, Vector ecology, Leishmaniasis

Background

Environmental changes derived from human actions, such as the rapid process of urbanization observed in emerging countries like Brazil, have changed the ecology of some species of phlebotomines and, consequently, the eco-epidemiology of the leishmaniasis. In respect of visceral leishmaniasis these changes lead to a significant impact on the distribution and mortality rates of the disease since the 1980s [1, 2]. Thus, four new patterns have emerged: the transmission of visceral leishmaniasis (VL) in fully urbanized areas; the rapid spread in cities of the Northeast and in various cities in the North, Central-West, and Southeast; an increase in the number of cases in urban areas compared to rural areas; and the emergence of large-scale urban epidemics with cycles of ten years [3].

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

* Correspondence: jandrade@cpqrr.fiocruz.br
¹Leishmaniasis Research Group, Phlebotomine Collection, National and International Reference Center for Phlebotomines, René Rachou Institute, Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



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

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

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

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

Methods

Study area

The study area, Barra do Guaicuí (17°12'S and 44°48'W), is a district located in the municipality of Várzea da Palma in the northern region of Minas Gerais, Brazil (Fig 1). According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics the municipality is represented by an area of 2,220.279 km² and a population, estimated in 2014, of 38,213 inhabitants [7].

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

Collection of phlebotomine sand flies

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

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

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

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

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

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

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

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

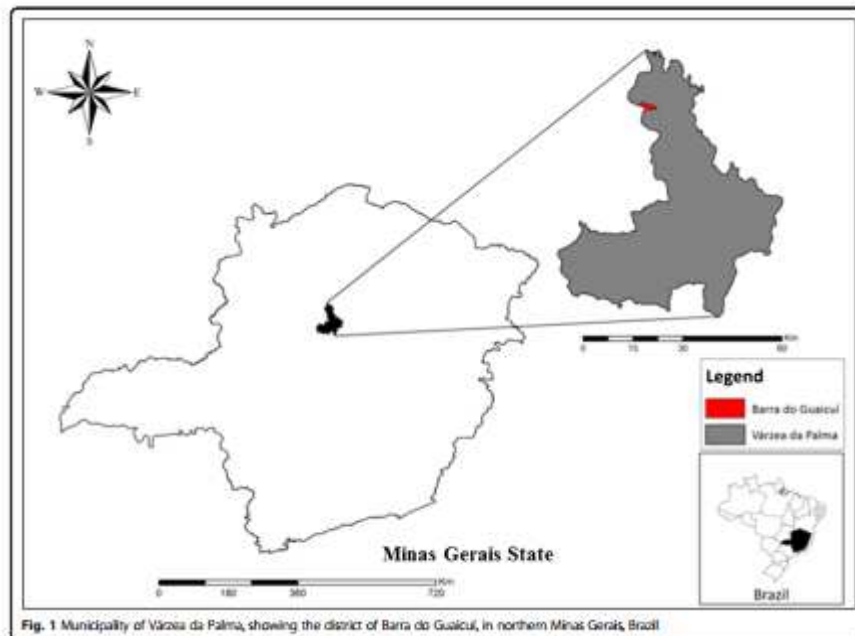


Fig. 1 Municipality of Várzea da Palma, showing the district of Barra do Guaiçú, in northern Minas Gerais, Brazil

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

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

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

Ethical approval

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

Results

The phlebotomine fauna was represented by 15 species. Table 1 shows the total number of phlebotomines collected by study area, and also the Shannon diversity index (H) and the evenness of Pielou (J). The monthly samples yielded 3,365 specimens of phlebotomines, of which 1,900 were males (56.46 %) and 1,465 were females (43.54 %).

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

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

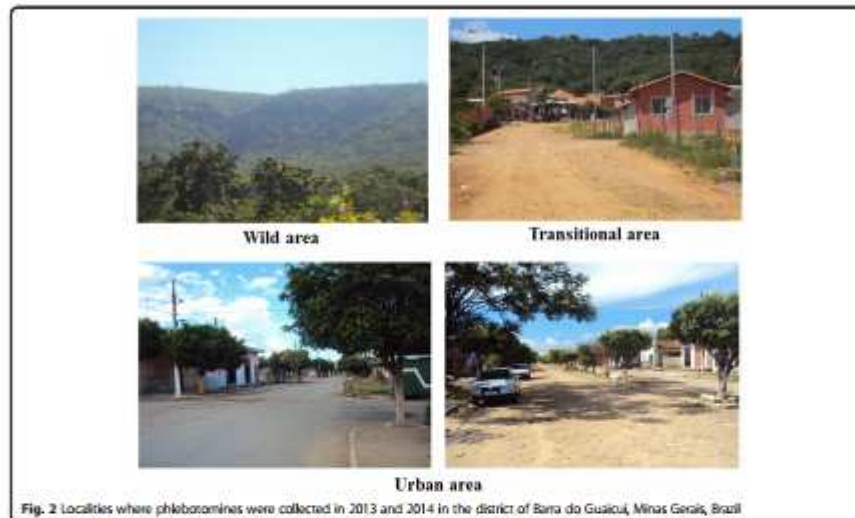


Fig. 2 Localities where phlebotomines were collected in 2013 and 2014 in the district of Barro do Guaiçú, Minas Gerais, Brazil

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

Taxonomic category	Urban area		Transitional area		Wild area						Total (%)
	A		T1		T2	T3		T4			
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
<i>Brumptomyia avellari</i>	13	15	33	25	48	102	9	10	22	40	317 (9.42)
<i>Evandromyia evandroi</i>	6	8	49	9	141	19	29	4	97	16	378 (11.23)
<i>Evandromyia leni</i>	16	35	6	36	27	105	9	35	28	140	527 (15.66)
<i>Evandromyia sallesi</i>	52	27	5	0	15	1	12	12	14	5	143 (4.25)
<i>Evandromyia termitophila</i>	1	3	2	0	12	3	4	0	14	1	40 (1.19)
<i>Evandromyia walkeri</i>	2	8	0	2	2	2	1	0	1	1	19 (0.56)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	101	435	2	19	1	12	0	4	2	5	581 (17.27)
<i>Microcygomyia quinquefasciata</i>	14	16	0	0	0	0	0	0	0	1	31 (0.92)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	589	539	10	17	1	4	4	2	9	0	1,175 (34.92)
<i>Nyssomyia nivalis</i>	52	76	2	3	0	2	0	1	0	1	137 (4.07)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.03)
<i>Ritonomyia pessaei</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2 (0.06)
<i>Pteromyia lutidans</i>	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	4 (0.12)
<i>Pteromyia bicruciatata</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	4 (0.12)
<i>Scopomyia cordifemur</i>	1	0	0	2	0	2	0	1	0	0	6 (0.18)
Total (%)	2,012 (59.79)		326 (6.72)		1,127 (33.49)						3,365 (100)
Diversity Index (H)	1.2823		1.8694		1.5572						1.8529
Evenness Index (J)	0.4999		0.7288		0.5901						0.6842

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

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

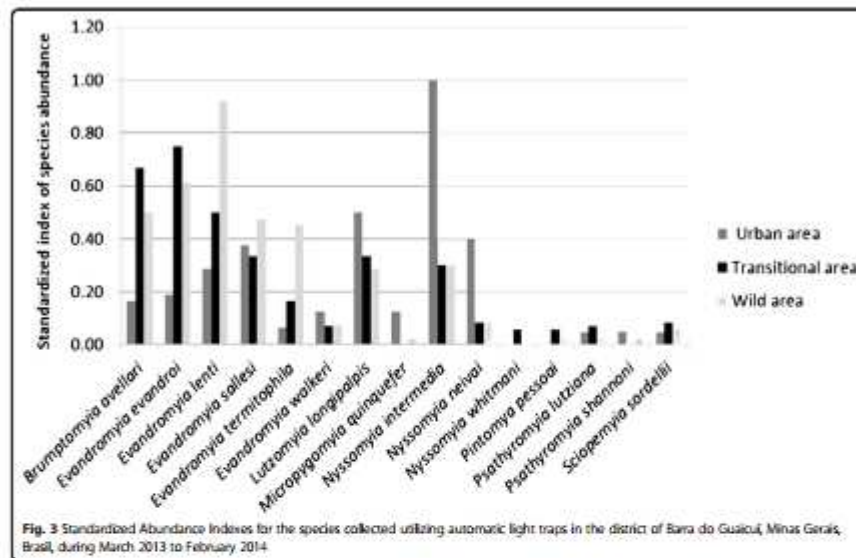
When comparing the number of specimens in each studied environment greater capture success is evident in the urban environment. This capture success can be explained by the presence of domestic animals near the places where the traps were exposed. However, with regard to diversity, the opposite was observed,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

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

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

Species	Study area						Total
	Urban		Transitional		Wild		
	N	%	N	%	N	%	
<i>Brumptomyia avellari</i>	28	0.86	58	1.78	231	7.09	317
<i>Evandromyia evandroi</i>	14	0.43	58	1.78	306	9.39	378
<i>Evandromyia levis</i>	51	1.57	42	1.29	434	13.32	527
<i>Evandromyia sallesi</i>	79	2.42 ^a	5	0.15 ^b	59	1.81 ^b	143
<i>Lucatomyia longipalpis</i>	536	16.45 ^a	21	0.64 ^b	24	0.74 ^b	581
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1128	34.62 ^a	27	0.83 ^b	20	0.61 ^b	1175
<i>Nyssomyia neivai</i>	128	3.93 ^a	5	0.15 ^b	4	0.12 ^b	137

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



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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CCS, DFS, RGAVS, FDR, GBT, AT and JDFAF participated in the collection of phlebotomines. CCS, DFS and JDFAF were responsible for the identification of specimens and CCS, CMFG and JDFAF participated in taxonomic discussions. CCS, CMFG, RGAVS, and JDFAF drafted the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

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

Author details

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

Received: 27 May 2015 Accepted: 11 July 2015

Published online: 19 August 2015

References

1. Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24:2927–40.
2. Oliveira EF, Silva EA, Casaril AE, Fernandes CES, Paranhos Filho AC, Gamara RM, et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. *J Med Entomol*. 2013;50:777–84.
3. Hershay MQ, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;7:403–9.
4. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Brasília: Ministério da Saúde. 2008. <http://dti2004.saude.gov.br/nk/nkweb/home/>.
5. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2nd edition. Brazil: Ministério da Saúde; 2005.
6. Sousa RG, Santos JF, Rodrigues HG, Telles Alexandre Avenir-Ferreira: Casos de leishmaniose visceral registrados no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. *Acta Sci Health Sci*. 2008;30:155–9.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Cidades. 2014. <http://www.cidadesibge.gov.br/ntsc/perfil.php?lang=pt&idmuni=317080>.

8. Instituto Estadual de Florestas. Inventário Florestal de Minas Gerais. 2014. <http://geodiv.maram.gov.br/ambiente/geo/geo/inventario/florestal>.
9. Kotze M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rudolf F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z*. 2006;15:199–63.
10. Hirwin GM, Barnett JM, Vasconcelos MF, Raposo MA, D'Angelo Neto S, Reavell L. Further comments on the avifauna of the middle São Francisco Valley, Minas Gerais, Brazil. *Bull Br Ornithol Club*. 2004;124:207–20.
11. Veloso HP, Rangel Filho AL Jr, Lima JCA. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE; 1991. 123.
12. Pujedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de poquiões insetos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:70–2.
13. Grupo C, Bermudez H, Declet JP, Falcão AL, Felkővári D, Ferro C, et al. Proposition of a standard description for Phlebotomine sand flies. *Parasitologia*. 1991;33:127–35.
14. Galati EAB. Morfologia e taxonomia. Classificação de Phlebotominae. In: *Phlebotomines do Brasil*. Edited by Rangel EF, Lainson R. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003: 23–306.
15. Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News*. 2007;118:351–6.
16. Roberts DR, Hai BP. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environ Entomol*. 1976;5:1007–13.
17. Hayek LAC, Buzos MA. *Surveying Natural Population*. New York: Columbia University Press; 1997. p. 347–89.
18. Saraiva L, Carvalho GML, Sanguinette CC, Carvalho DAA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:843–6.
19. Rigau PD, Shimabukuro PHF, Quaresima PF, Coelho IR, Tonelli GB, Silva KMS, et al. Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *Parasit Vectors*. 2014;7:220.
20. Rangel EF, Lainson R. *Ecologia das Leishmanioses. Phlebotomines do Brasil*. Edited by Rangel EF, Lainson R. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003: 291–300.
21. Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neiva* (Pinto, 1908) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:845–7.
22. Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresima PF, Lima AC. Natural infection of *Lutzomyia neiva* and *Lutzomyia setleri* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46:1159–63.
23. Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACM, Gontijo CMF. Naturally Infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:407–14.
24. Margonai C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Galanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol*. 2010;47:1212–9.
25. Brazil RP, Passos WL, Fuzari AA, Falcão AL, Andrade Filho JD. The peridomestic sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J Vector Ecol*. 2006;31:118–20.
26. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Kenia MP, Gonçalves CM, et al. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:49–52.
27. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Bezerra RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:147–52.
28. Fountini DP. Novas observações sobre a biologia de flebotomíneos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). *Arq Hig Saude Publica*. 1960;25:209–21.
29. Shielbeck IA, Guitton N. Observações sobre *Calazar* em Jacobina, Bahia II - Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Rev Bras Malariol Doen Trop*. 1969;21:561–8.
30. Marcondes CB, Day JR, Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *L. neiva* and *L. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;51:725–6.
31. Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 2002;81:143–50.

32. Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco do leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Boboquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Parasitol. Trop.* 2003;33:235–41.
33. Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Escrivão IAC, Donal MEC, et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:699–74.
34. Alves GR, Oshiro ET, Leite MC, Melo AV, Ribeiro LM, Matos NLF, et al. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cacores, state of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:437–43.
35. Ribeiro LM, Oshiro ET, Souza DA, Fernandes MF, Santos KM, Matos NLF, et al. Biological aspects of immature stage of *Lutzomyia whitmani* (Artunovi & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in laboratory conditions. *Rev Bras Entomol.* 2015;59:100–3.
36. Galati EAB, Maracci AM, Andrade RMG, Gonçalves CA, Bueno EFM. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in the speleological province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Entomol.* 2010;54:677–87.
37. Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7 – Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ.* 1989;23:136–41.
38. Marcondes CB, Santos-Neto LG, Lovato AL. Ecology of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34:55–60.
39. Carvalho GMB, Brasil RP, Ramos MCF, Meira PLS, Zandino APLA, Botelho HA, et al. Ecological Aspects of Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) from a Cave of the Speleological Province of Barroil Brazil. *PLoS ONE.* 2013;8:77158.
40. Gomes AC, Rabello EX, Santos JF, Galati EAB. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos a ecótopos artificiais com infestação especial a *Psychodopygus intermedius*. *Rev Saúde Públ.* 1980;14:549–56.
41. Gomes AC, Rabello EX, Santos JF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e intraflorestal. *Rev Saúde Públ.* 1983;17:23–30.
42. Souza NA, Andrade-Cowling CA, Villola ML, Rangel EF. The Phlebotominae sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:319–24.
43. Mayo RC, Casanova C, Mascareli LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, et al. 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.* 1996;21:339–45.
44. Andrade Filho JD, Valério MB, Andrade WA, Brasil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34:123–9.
45. Lobato CF, Silva DA, Galati EAB. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:581–5.
46. Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favoured locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop.* 2011;117:137–45.
47. Nascimento BM, Saraiva L, Teixeira Neto RGA, Meira PLS, Sanguinette CC, et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil. *Acta Trop.* 2013;125:262–8.
48. Carvalho GMB, Gontijo CMF, Falcão AL, Andrade Filho JD. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte Brazil. *J Med Entomol.* 2010;47(6):972–4.
49. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:811–27.
50. Régio FD, Rugani JMN, Shmushaturo PHF, Tonelli GB, Quaresima PF, Gontijo CMF. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve Brazil. *PLoS ONE.* 2015;10:e0122038.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

