

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

**ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS EM ÁREA DE
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA
GRANDE, ESTADO DE MATO GROSSO**

por

Nanci Akemi Missawa

**Belo Horizonte - MG
Fevereiro/2008**

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

**ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS EM ÁREA DE TRANSMISSÃO
DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA GRANDE,
ESTADO DE MATO GROSSO**

por

Nanci Akemi Missawa

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências na área
de concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias

**Belo Horizonte - MG
Fevereiro/2008**

M678e
2008

Missawa, Nanci Akemi.

Ecologia de flebotomíneos capturados em área de transmissão de Leishmaniose Visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso / Nanci Akemi Missawa. - Belo Horizonte, 2008.

xix, 171 f.: il.; 29,7 x 210 mm.

Bibliografia: f. 146-171

Tese (Doutorado) - Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Flebotomíneos 2. Lutzomyia 3. Leishmaniose visceral
4. Várzea Grande 5. Brasil I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientador).

CDD – 22. ed. – 616.075 61

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

ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA GRANDE, ESTADO DE
MATO GROSSO

por

Nanci Akemi Missawa

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Edelberto Santos Dias (CPqRR/FIOCRUZ) - Presidente

Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti (CPqRR/FIOCRUZ)

Dr. Rodrigo Pinto Pedro Soares (CPqRR/FIOCRUZ)

Dr. José Carlos Miranda (CPGM/FIOCRUZ)

Dr. George Luis Lins Machado Coelho (UFOP)

Dr. Ricardo Andrade Barata (CPqRR/FIOCRUZ) - Suplente

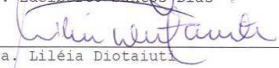
Tese defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2008.

Ata da décima primeira defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Nanci Akemi Missawa, sob a orientação do Dr. Edelberto Santos Dias.

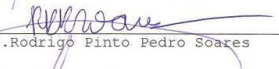
Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e oito, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da décima primeira tese de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese da aluna Nanci Akemi Missawa intitula-se " Ecologia de flebotomíneos capturados em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Edelberto Santos Dias - CPqRR/Fiocruz, (orientador e presidente da banca), Dra. Liléia Diotaiuti - CPqRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Rodrigo Pinto Pedro Soares - CPqRR/Fiocruz (membro titular), Dr. José Carlos Miranda - CPqGM/Fiocruz (membro titular), Dr. George Luis Lins Machado Coelho - UFOP (membro titular) e Dr. Ricardo Andrade Barata - CPqRR/Fiocruz (suplente). Após arguir a aluna e considerar se a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Edelberto Santos Dias, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e cinco de fevereiro de dois mil e oito.



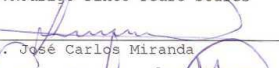
Dr. Edelberto Santos Dias



Dra. Liléia Diotaiuti



Dr. Rodrigo Pinto Pedro Soares



Dr. José Carlos Miranda



Dr. George Luis Lins Machado Coelho

Tecendo a Manhã

*"Um galo sozinho não tece a manhã:
ele precisará sempre de outros galos.*

*De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro: de um outro galo
que apanhe o grito que um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzam
os fios de sol de seus gritos de galo
para que a manhã, desde uma tela tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.*

*E se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.*

*A manhã, toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão".*

João Cabral de Melo Neto

PALAVRAS DOS AMIGOS

As rotinas da saúde são sempre feitas considerando as interdependências na elaboração de escalas das equipes de campo, no diálogo com os gestores, nos impasses, nas dificuldades do dia-a-dia enfim, tudo é feito em conjunto, considerando sempre os 'muitos galos' que vão palmiilhando o contexto. Dizem que mesmo quando estamos 'sós' na experiência do ADOECER, estamos intercomunicados.

Nandi, fico muito honrada por você delicadamente ter pedido a mim a sugestão poética para compor uma das páginas da tese de seu doutorado.

Quero que saibas que você conseguiu ao longo destes anos "tecer" graciosamente as tramas sutis das manhãs.

Espero sinceramente que possamos juntos, todos nós do Laboratório:

Clásson, Angê, Shirley, Veruska, Giovana e Hilda,

como os galos do poema, cruzar os fios que certamente sustentarão

novas possibilidades com você.

Um beijo, obrigada pelo carinho.

Hilda Rodrigues

DEDICATÓRIA

Dedico com amor ao meu esposo MOACIR e as nossas filhas MARIANA e FABIANA, pela linda família que formamos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. EDELBERTO SANTOS DIAS pela confiança, pelos valiosos ensinamentos e pela forma como me conduziu no desenvolvimento deste trabalho, com paciência e firmeza, e pelo seu exemplo de profissional dedicado à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida.
- Ao Ministério da Saúde, através do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade.
- Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), nas pessoas de seu ex diretor Roberto Senna e seu diretor Álvaro José Romanha pelo auxílio recebido.
- À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na pessoa de sua ex coordenadora, Dra. Virgínia Torres Schall e de sua coordenadora Dra. Cristiana Ferreira Alves Brito pela qualidade do curso.
- Aos responsáveis pelo Laboratório de Leishmanioses (CPqRR) nas pessoas do Dr. Edelberto Santos Dias, Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo e D. Alda Lima Falcão pela disponibilidade de uso dos laboratórios, dos equipamentos e da coleção entomológica; e às colegas Érika Monteiro Michalsky e Karla de Sena Guedes pelo apoio na realização dos experimentos moleculares.
- À Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso (SES/MT), através da Coordenadoria de Vigilância Ambiental (Vera Lúcia Dias Lopes e Oberdan Ferreira Coutinho Lira) e da Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses (Gláucie Pinheiro Cavalcanti, Ana Paula Godoy de Almeida e Marlene da Costa Barros) pela licença para qualificação profissional concedida.
- Aos colegas do Laboratório de Entomologia da SES/MT, Angelina Marinho da Silva, Cladson de Oliveira Souza, Delma Moreira, Giovana Belém Moreira Lima Maciel, Hilda Rodrigues, Sandra Cristina Negreli Moreira Hermes, Shirley Rodrigues Ramos, Veruska Nogueira de Brito e Vilma Jucineide Toledo pelo trabalho em equipe, pelo companheirismo e pela amizade.
- Aos colegas do Escritório Regional de Saúde da Baixada Cuiabana, em nome de sua diretora Leila Maria Boabaid Levi e dos técnicos Helena de Souza Leite, Oscar Luiz Pereira da Silva Neto, Luis Eduardo de Freitas Bueno, e dos motoristas Nazarino Campos e Adelino Alves da Costa pelo veículo disponibilizado para as capturas e pelo apoio no trabalho de campo.
- Ao UNIVAG Centro Universitário, nas pessoas do Dr. Drauzio Medeiros, Prof. MS. Luiz Duarte Silva Júnior, Prof. MS. Maria Saleti Ferraz Dias Ferreira e Prof. MS. Márcia Aparecida Nassarden de Abreu, pelo incentivo à qualificação profissional.

- Ao Dr. Elias Seixas Lorosa do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pela colaboração no exame de preferência alimentar.
- À técnica Joelma Leite da Silva Duarte da Vigilância Epidemiológica da SES/MT pelos dados epidemiológicos cedidos.
- Ao prof. MS. Gustavo Leandro da Cruz Mestre pela bibliografia disponibilizada.
- Ao 9º Distrito de Meteorologia do Instituto Nacional de Meteorologia pelos dados climatológicos disponibilizados.
- À Banca do exame de qualificação, Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti e Dr. Nelder Figueiredo Gontijo pelas valiosas contribuições.
- À Banca de defesa da tese, Dr. George Luis Lins Machado Coelho, Dr. José Carlos Miranda, Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti, Dr. Ricardo Andrade Barata e Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares pela avaliação.
- Aos colegas da pós-graduação pelo agradável convívio.
- Às amigas Eloísa Bernardino Veríssimo e Walquíria da Conceição Ferreira pelo carinho e amizade com que me acolheram em sua casa.
- À amiga Alessandra Tavares Morini Lopes pelo alegre convívio.
- À amiga Ana Lúcia Maria Ribeiro pelo apoio e incentivo.
- Aos amigos Vânia Maria Tonello e Gonçalo Moreno pela amizade e presença constante durante esta jornada.
- Ao meu pai, Tadayoshi Missawa, sempre presente ao meu lado.
- À minha mãe, Toshiko Missawa pelo incentivo e carinho.
- Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos pela alegria de sermos uma grande família.
- Aos moradores das residências pesquisadas, aqui anônimos, mas que representam a grande maioria da população brasileira, corajosos trabalhadores que sobrevivem de pouco e por pouco, os meus mais sinceros agradecimentos.
- Finalmente, agradeço a todas as pessoas que contribuíram comigo de diversas maneiras e que são também, autoras deste trabalho.

A todos, obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 A Leishmaniose Visceral	20
1.2 Agentes etiológicos da LV	23
1.3 Reservatórios da LV	24
1.4 Vetores da LV	26
1.4.1 Influência dos fatores ambientais sobre a ocorrência e densidade de flebotomíneos	28
1.4.2 Preferência alimentar e conteúdo intestinal de flebotomíneos	30
1.5 Estudo molecular para detecção de infecção por <i>Leishmania</i> spp.	31
1.6 Vigilância epidemiológica, prevenção e controle da LV	33
1.7 Situação da LV no estado de Mato Grosso	36
1.8 Situação da LV no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso	38
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Área de estudo	43
4.2 Métodos de captura	49
4.2.1 Coletas sistematizadas	49
4.2.2 Coletas não sistematizadas	50
4.3 Preparação e montagem dos espécimes	53
4.4 Identificação das espécies	53
4.5 Dados bioclimáticos	54
4.6 Preferência alimentar	54
4.7 Casos Humanos de LV	54
4.8 Inquérito Canino Amostral	55
4.9 Extração de DNA de <i>Leishmania</i> sp.	55
4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) genérico e eletroforese em gel de poliacrilamida 6%	56
4.11 Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida 10%	58

4.12	Reação em cadeia da polimerase (PCR) de gene constitutivo específico de flebotomíneo (cacofonia) e eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.....	59
4.13	Controle de contaminação por DNA exógeno.....	60
4.14	Cálculo da taxa mínima de infecção.....	60
4.15	Análise estatística dos dados.....	60
4.16	Considerações éticas.....	61
5.	RESULTADOS.....	62
5.1	Fauna de flebotomíneos.....	62
5.2	Dados bioclimáticos.....	73
5.3	Fauna de flebotomíneos e os dados bioclimáticos.....	74
5.4	Preferência alimentar de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	77
5.5	Casos humanos de LV.....	78
5.6	Inquérito canino.....	80
5.7	Relação entre vetor, prevalência canina e casos humanos de LV.....	80
5.8	DNA de <i>Leishmania</i> spp. em espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> naturalmente infectados.....	81
5.9	DNA de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> em <i>L. longipalpis</i> naturalmente infectadas.....	83
5.10	DNA de flebotomíneos (cacofonia).....	83
6.	DISCUSSÃO.....	85
7.	CONCLUSÕES.....	96
8.	ANEXOS.....	98
8.1	Anexo 1: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/MT.....	99
8.2	Anexo 2: Artigo: Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brasil.....	100
8.3	Anexo 3: Artigo: Preferência alimentar de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, Brasil.....	107
8.4	Anexo 4: Artigo: <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis transmission area in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil.....	124
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudo: município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil	45
Figura 2. Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, evidenciando a área de transmissão	46
Figura 3. Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, evidenciando os bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá e os pontos de captura de flebotomíneos	47
Figura 4. Bairros pesquisados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 (A: Eldorado, B: São Matheus, C: Parque Sabiá).....	48 e 49
Figura 5. Instalação de armadilhas de CDC no intradomicílio (A e B). Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005.....	51
Figura 6. Instalação de armadilhas de CDC no peridomicílio (A e B). Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005.....	52
Figura 7. Distribuição mensal de flebotomíneos capturados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	68
Figura 8. Flebotomíneos capturados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	68
Figura 9. Flebotomíneos capturados nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	69
Figura 10. Flebotomíneos capturados no ambiente intradomiciliar, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	69
Figura 11. Flebotomíneos capturados no ambiente peridomiciliar, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	70
Figura 12. Distribuição percentual de flebotomíneos capturados de acordo com o sexo, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	71
Figura 13. Flebotomíneos capturados nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	72
Figura 14. Variáveis bioclimáticas no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 (Fonte: 9º Distrito de Meteorologia/MT/INMET).	74

Figura 15. Número de indivíduos de flebotomíneos em relação à temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm ³) no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	75
Figura 16. Diagrama de dispersão entre o número de flebotomíneos capturados e as variáveis ambientais temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm ³) no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	76
Figura 17. Preferência alimentar de <i>Lutzomyia longipalpis</i> no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 1998 a junho de 2006	78
Figura 18. Histórico dos casos humanos de LV no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 1998 a junho de 2006	79
Figura 19. Relação de número de flebotomíneos e ocorrência de casos humanos de LV nos bairros pesquisados do município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	79
Figura 20. Produto de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de <i>Leishmania</i> spp.	81
Figura 21. Produto de PCR após amplificação de DNA de amostras positivas de flebotomíneos (2, 4 e 7), utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de <i>Leishmania</i> spp.....	82
Figura 22. Produto de amplificação por PCR de região conservada de minicírculo kDNA de <i>Leishmania</i> após digestão com endonuclease ApaI e HaeIII.....	83
Figura 23. Produto de amplificação por PCR do gene constitutivo do gênero <i>Lutzomyia</i> (gene da cacofonia). Iniciadores 5Llcac/3Llcac	84

LISTA DE TABELAS

Tabela I . Flebotomíneos capturados, por sexo e por ambiente, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	63
Tabela II. Flebotomíneos capturados com armadilha de CDC por espécie, sexo e mês, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	64
Tabela III. Distribuição dos flebotomíneos coletados por bairro, sexo, ambiente e mês, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	66
Tabela IV. Flebotomíneos coletados por bairro, ambiente e sexo no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	67
Tabela V. Condições climáticas no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	73
Tabela VI. Fêmeas de <i>L. longipalpis</i> segundo teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.	77
Tabela VII. Preferência alimentar de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.....	78
Tabela VIII. Prevalência canina de inquérito realizado nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	80
Tabela IX. Número de <i>L. longipalpis</i> coletados, casos humanos de LV e prevalência canina por bairro pesquisado, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.....	80
Tabela X. Frequência de "pools" de <i>L. longipalpis</i> infectados por <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , por bairro, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APM: Área de Aproveitamento Múltiplo
CCZ: Centro de Controle de Zoonoses
CDC: Center for Diseases Control and Prevention
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CN: Controle Negativo
COPEPI: Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica
COVSAM: Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental
CP: Controle Positivo
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
DDW: Distilled De-ionized Water
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxinucleosídeo trifosfato
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA: Exame de imunoadsorção enzimática
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
GEVVAN: Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses
GPS: Sistema de Posicionamento Global
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
IOC: Instituto Oswaldo Cruz
kDNA: DNA do cinetoplasto
LALEI: Laboratório de Leishmanioses
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
LVH: Leishmaniose Visceral Humana
M: moles
mA: mili ampéres
mM: milimolar
MS: Ministério da Saúde

MT - Laboratório: Laboratório Central de Saúde Pública
μl: microlitros
ng: nanogramas
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial de Saúde
P: Significância Estatística
PA: Puramente Analítico
pb: pares de bases
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PM: Peso Molecular
pH: potencial Hidrogeniônico
PreC: Prevalência Canina
R²: Coeficiente de Determinação Linear
RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm: rotações por minuto
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SES/MT: Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso
SFM: Sistema Fagocitário Mononuclear
SINAN: Sistema Nacional de Agravos Notificáveis
SMS: Secretaria Municipal de Saúde
SUVSA: Superintendência de Vigilância em Saúde
SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde
TA: Tampão da Amostra
Taq: DNA polimerase termoestável derivada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*
TBE: solução de Tris-borato/EDTA
TE: solução de Tris-EDTA
TI: Taxa de Infecção
Tris: Tris hidroximetil amino metano
U: Unidades
V: Volts
WHO: World Health Organization

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) afeta o homem e outros animais, e sua transmissão, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais, está atualmente ocorrendo em centros urbanos de médio e grande porte, em área domiciliar ou peridomiciliar. Os flebotomíneos desempenham papel de grande importância médica e a principal espécie vetora da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, protozoário causador da LV no Brasil, é *Lutzomyia longipalpis*. O trabalho teve como objetivo levantar a fauna flebotomínica, verificar a capacidade dos flebotomíneos adentrarem o ambiente domiciliar, conhecer a distribuição sazonal, a preferência alimentar e a taxa de infecção natural de *L. longipalpis* em área de transmissão de LV, além de correlacionar os dados vetoriais com inquéritos caninos e ocorrência de casos humanos na área. Os flebotomíneos foram capturados nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, no município de Várzea Grande/MT. As coletas foram realizadas mensalmente no intra e peridomicílio, durante quatro noites consecutivas em 10 residências, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006, utilizando-se armadilha de luz do tipo CDC. Foram capturados 12.833 flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (22 espécies) e *Brumptomyia* (uma espécie). A espécie dominante foi *L. longipalpis* com frequência relativa de 65,23% e predominância de machos no ambiente peridomiciliar. A partir do teste de precipitina, observou-se que as fêmeas alimentaram-se preferencialmente de sangue de aves (30,77%). Foi verificada uma taxa de infecção natural de 0,71% de *L. (L.) infantum chagasi* em “pools” de 10 fêmeas de *L. longipalpis* através da PCR-RFLP. Observou-se a ocorrência de *L. longipalpis* em todos os meses do ano, com aumento da densidade no período chuvoso (entre os meses de outubro e março), sendo maior após o registro das primeiras chuvas. O conhecimento da distribuição do vetor infectado auxilia na compreensão da eco-epidemiologia da doença para subsidiar medidas eficazes de controle da doença.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, Leishmaniose Visceral, Várzea Grande, Mato Grosso, PCR-RFLP.

ABSTRACT

The Visceral Leishmaniasis (VL) affects humans and other animals, and its transmission usually concentrated in rural and wild areas is currently occurring in larger towns. The sandfly *Lutzomyia longipalpis* play a role of major importance in the transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, aetiological agent of VL in Brazil. The study aimed to determine the sandfly fauna, to evaluate the ability of sandflies to enter artificial environments, to know the seasonal distribution, the food preference and the rate of infection with *L. (L.) infantum chagasi* in the area of VL transmission. Also the vector data and dogs infection were correlated with the occurrence of human cases in the area. The sandflies were captured in the neighborhoods of Eldorado, São Matheus and Parque Sabiá, in the Municipality of Várzea Grande/MT. The collections were made monthly in the intra and peridomiciliary areas, for four consecutive nights in 10 homes, from January 2004 to June 2006, using CDC traps. The number of sandflies captured was 12,833 belonging to the genera *Lutzomyia* (22 species) and *Brumptomyia* (one species). The prevalent species was *L. longipalpis* (65.23%) and a higher frequency of males was observed. Precipitation tests revealed that females were often found bed on birds (30.77%). The natural infection by *L. (L.) infantum chagasi* in pools of 10 females of *L. longipalpis* through PCR-RFLP was 0.71%. Occurrence of *L. longipalpis* was detected throughout the year, with increased density in the rainy season (between October and March), and soon after the first rains. The knowledge generated in this work might help to understand the eco-epidemiology of the disease aiming to develop procedures for disease control.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, Visceral Leishmaniasis, Várzea Grande, Mato Grosso, PCR-RFLP.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Leishmaniose Visceral

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as leishmanioses como uma das principais zoonoses mundiais (WHO, 2003). A leishmaniose visceral (LV) que afeta animais, pode apresentar-se como uma antroponose ou antropozoonose, quando o homem atua como reservatório (Passos *et al.*, 1993), é uma doença crônica sistêmica e grave, que atinge crianças, adultos e jovens ou pessoas imunodeprimidas e caracterizada por febre de longa duração e outras manifestações, e quando não tratada, evolui para óbito em um ou dois anos após o aparecimento da sintomatologia (Alves e Bevilacqua, 2004).

O parasito se multiplica em local onde se concentram células do sistema monocítico fagocitário (SFM) como o baço, o fígado e a medula óssea. Os pacientes apresentam febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia, sendo o escurecimento da pele provocado somente no calazar indiano (Marzochi *et al.*, 1999). Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2005b), as manifestações clínicas da LV decorrem do desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do SFM, da resposta imunitária do indivíduo e do processo inflamatório subjacente. Em muitas situações, o diagnóstico diferencial só pode ser concluído através de provas laboratoriais, já que as áreas endêmicas se superpõem em grandes faixas do território brasileiro, somando-se a essa entidade outras patologias como malária, brucelose, febre tifóide, esquistossomose hepatoesplênica, forma aguda da doença de Chagas, linfoma, mieloma múltiplo, anemia falciforme, etc.

A doença possui distribuição mundial, encontrada nas Américas, África, sul da Europa, Ásia e Oriente Médio (Lainson e Shaw, 1987). Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que o Brasil contribui com 90% dos casos do continente (Grimaldi-Jr *et al.*, 1989; WHO, 1990; Soares e Turco, 2003). Nas Américas, as leishmanioses têm algumas características epidemiológicas comuns, ocorrendo em pessoas residentes em áreas rurais ou que tiveram contato com habitats silvestres. As mudanças no comportamento humano e as alterações do ambiente, podem ter um maior impacto na prevalência e no padrão de transmissão da LV (Grimaldi-Jr. e Tesh, 1993).

No Brasil, a LV atingia as populações rurais de vários estados, inclusive Goiás, Tocantins e Mato Grosso do Sul (Marzochi e Marzochi, 1994), sendo que o primeiro caso no país foi registrado em 1913, em paciente de Mato Grosso (Alencar e Dietze, 1991). Apesar da conhecida subestimação de casos, o Brasil registrou um aumento na incidência da doença nos últimos 20 anos (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). É um crescente problema de saúde pública no país e encontra-se em franca expansão geográfica, distribuída em 19 estados e em 1551 municípios no período de 1994 a 2002. Têm sido registrados aproximadamente 3.000 casos/ano no país, com letalidade média de 8% a 10% (Gontijo e Melo, 2004).

As condições para a urbanização da doença têm sido uma progressiva adaptação dos parasitos (Marzochi e Marzochi, 1994; Ashford, 2000) e dos flebotomíneos aos ambientes modificados pela antropização, relacionado ao constante processo migratório de populações rurais para áreas urbanas (Gállego, 2004; Barata *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005; Margonari, 2005; Costa *et al.*, 2003). Essa doença metaxênica passou a ser naturalmente transmitida em áreas peri-urbanas, graças à emergência ou reemergência de seus vetores nessas áreas (Tauil, 2006). Dados confirmam a urbanização da doença em grandes centros urbanos (Aguilar *et al.*, 1998; Luz *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Bevilacqua *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005), sendo que Bevilacqua *et al.* (2001), Barata (2005), Margonari (2005) e Alves *et al.* (2005) sugerem que o fator sócio-econômico seja um dos determinantes da LV no Brasil.

São múltiplas as infecções que têm determinantes nas atividades humanas como a invasão de áreas florestais, atividades rotineiras em horários inadequados, habitações precárias, criação de animais domésticos próximo às residências, que podem propiciar a infecção dos homens e fortalecendo seu conceito de zoonose. Assim sendo, o homem estabelece comunidades que propiciam a instalação de agentes infecciosos, além da existência e ação de mecanismos que propiciem essa associação.

Pouco se conhece sobre a epidemiologia da LV em focos urbanos, criando condições favoráveis para sua emergência e reemergência, pois apresenta incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente, a partir de um complexo de fatores como mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo

homem, fatores pouco estudados ligados aos vetores (variantes genéticas), e novos fatores imunossupressivos, tais como infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos, onde problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes e resistência aos fármacos de uso corrente e ausência de uma vacina canina e/ou humana (Gontijo e Melo, 2004).

No Brasil, a população tradicionalmente marginalizada, geralmente exposta à falta de saneamento básico e de serviços de saúde, às doenças endêmicas, ao desemprego, e à fome, vive em áreas periurbanas, onde a distribuição geográfica do HIV e da leishmaniose se sobrepõem (Lucena *et al.*, 2007; Rabello *et al.*, 2003). A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ao destruir o sistema imunitário, manifesta-se pelo desencadear das doenças oportunistas, onde se incluem as infecções, dentre elas, as causadas por protozoários. É assim que a LV se torna uma das infecções oportunistas mais freqüentes no doente HIV (Maia-Elkhoury *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007b; Alves e Bevilacqua, 2004; Rosenthal *et al.*, 2000; Alvar *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 1994).

A coinfeção resulta de uma deficiência cumulativa da resposta imunitária: AIDS aumenta o risco da LV em 100 a 1000 vezes e o HIV pode induzir o crescimento da *Leishmania* dentro dos macrófagos; a infecção por *Leishmania*, por sua vez, pode induzir a ativação do HIV latente e acelerar sua replicação nas células monocíticas (Desjeux e Alvar, 2003; WHO, 2000; Wolday *et al.*, 1999). Ambos os agentes infectam e multiplicam-se no interior dos macrófagos e podem potencialmente desregular o sistema imunitário.

Na coinfeção ocorre o aparecimento de manifestações cutâneas desconhecidas, sobretudo em doentes com LV, leishmanioses cutâneas nas suas várias formas e as leishmanioses mucocutâneas perdem definitivamente as características que as identificaram durante séculos, tornando-se assim, a leishmaniose, uma doença multifacetada após o advento da AIDS (Catorze, 2005). Muitos casos de coinfeção provavelmente não são determinados pela falta de conhecimento entre os clínicos ou acesso limitado aos métodos apropriados para o diagnóstico. Borges *et al.* (1999) e Catorze (2005) discutiram a hipótese da transmissão parentérica de homem para homem, a transmissão antroponótica, que pode ser natural (picada de inseto) ou artificial por transmissão mecânica (agulhas e seringas contaminadas). No Brasil, os toxicodependentes por via endovenosa constituem 7% do total de doentes coinfectados (Rabello *et al.*, 2003).

Oliveira *et al.* (2007) ressaltam as possibilidades de quadros clínicos atípicos de LV em associação com lúpus eritematoso sistêmico e sugerem a inclusão deste diagnóstico nos diagnósticos diferenciais das leishmanioses em áreas endêmicas.

1.2 Agentes etiológicos da LV

Os agentes etiológicos da LV são protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, com três espécies que causam a doença: *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia e África, *L. (L.) infantum* na Ásia, Europa e África, e *L. (L.) infantum chagasi* nas Américas (Lainson e Rangel, 2003; Shaw, 2006). Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo, se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. (L.) infantum*, ou há milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. (L.) chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson e Shaw, 1987). Entretanto, a partir de estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares, autores consideram a *L. (L.) chagasi* e a *L. (L.) infantum* uma única espécie (Rey, 2001; Gontijo e Melo, 2004) e aceitam a hipótese da introdução recente nas Américas (Maurício *et al.*, 2000). Lainson e Rangel (2003) e Shaw (2006) adotam a nomenclatura *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Enquanto a controvérsia não se resolve, consideraremos *L. (L.) infantum chagasi*, o agente etiológico da LV no Brasil.

O ciclo biológico da *L. (L.) infantum chagasi* é do tipo heteroxênico (Neves, 2005), e os protozoários desse gênero são parasitos unicelulares que apresentam formas evolutivas distintas durante o seu ciclo de vida. As formas promastigotas ou flageladas são encontradas no intestino médio dos insetos vetores e a forma amastigota ou aflagelada é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos (Grossage *et al.*, 2003).

A infecção do vetor ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, das formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* presentes na derme do hospedeiro infectado, as quais passarão a evoluir no trato digestivo médio do inseto, dependendo da localização poderá ser considerada peripilária ou suprapilária (Lainson e Shaw, 1987). Estas amastigotas sofrem uma

divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas, que por processos sucessivos de divisão, multiplicam-se ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma membrana peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto (Pimenta *et al.*, 1997). Após a digestão do sangue, a membrana peritrófica se rompe em sua porção anterior pelas quitinases e as formas promastigotas ficam livres. As formas promastigotas em que se aderir às microvilosidades do epitélio do intestino médio do vetor (Soares *et al.*, 2002). Em seguida, ocorre migração dos flagelados (ou parasitos) para porções anteriores do intestino, se diferenciando futuramente em promastigotas metacíclicas, que são formas móveis, ativas, finas e com flagelo bastante longo (Sacks e Silva, 1987).

Ao exercer o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado (homem ou outro reservatório), o flebotomíneo inocula as formas promastigotas infectantes presentes no trato digestivo anterior (Sacks, 1989). Dentro do macrófago, as formas promastigotas assumem a forma amastigota e, passam a multiplicar-se por divisão binária até o rompimento da célula, sendo endocitadas por novos macrófagos, disseminando-se pelos tecidos do sistema fagocítico mononuclear como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, completando o ciclo heteroxeno dos parasitos e sua propagação a novos indivíduos susceptíveis (Zilberstein e Shapira, 1994).

1.3 Reservatórios da LV

O cão (*Canis familiaris*) é o mais importante reservatório doméstico de *L. (L.) infantum chagasi* em localidades onde a LV é endêmica (Deane e Deane, 1954; Deane e Deane, 1955a; Deane e Deane, 1962; França-Silva *et al.*, 2003). Recentemente, gatos (*Felis catus*) foram encontrados naturalmente infectados em área de transmissão de LV no estado de São Paulo (Rey *et al.*, 2005) e sua investigação como possível hospedeiro de *Leishmania* é sugerida por Dantas-Torres (2006). O rato doméstico (*Rattus rattus*) é suspeito de ser reservatório secundário da LV na Venezuela (Zulueta *et al.*, 1999) e de participar do ciclo zoonótico doméstico no Brasil (Costa, 2002; Gontijo *et al.*, 2002).

Hospedeiros silvestres incriminados como reservatórios de LV são as raposas *Dusycion vetulus* encontradas no nordeste do Brasil e *Cerdocyon thous* na Amazônia brasileira (Deane e Deane, 1962; Lainson e Shaw, 1987), os gambás *Didelphis albiventris* no estado da Bahia (Sherlock *et al.*, 1984; Rey, 2001; Costa, 2005), *Didelphis marsupialis* na

Colômbia (Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1994), *Didelphis* sp. em Bauru/SP (Santiago e Lima, 2007), o chacal *Canis aureus*, o lobo *Canis lupus* e a raposa *Vulpes vulpes* no Velho Mundo (Lainson *et al.*, 1987). Lima *et al.* (2007) detectaram o anticorpo anti-k39 nos roedores silvestres *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Bolomys lasiurus* e *Galea spixxi*, demonstrando a importância desses animais como possíveis reservatórios de *L. (L.) infantum chagasi* no município de São Vicente Férrer/PE.

A presença de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* detectada em amostra do roedor silvestre *Thrichomys apereoides*, pode sugerir o seu envolvimento no ciclo enzoótico silvestre da LV em Araçuaí/MG (Costa, 2002). Travi *et al.* (1998) demonstraram infecção em *Proechimys canicollis* em foco endêmico de LV na Colômbia.

Por serem animais sinantrópicos, as raposas podem fazer a conexão entre o ciclo silvestre e o doméstico que é mantido pelos cães que atuam como reservatórios domésticos da infecção (Deane e Deane, 1955a; Alvar *et al.*, 2004). O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, que permite fácil infecção dos flebotomíneos (Deane e Deane, 1954).

Os cães são implicados como importantes reservatórios em vários focos de áreas rurais e periurbanas (Marzochi e Marzochi, 1994; Silva *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a doença canina precede a doença humana, sendo uma das responsáveis pelo avanço espacial e temporal dos casos humanos. Vários autores associam a ocorrência de altas taxas de soropositividade canina à LV humana (Deane e Deane, 1955a; Alencar, 1961; Bettini e Gradoni, 1986; Lainson e Shaw, 1987; Evans *et al.*, 1990; Dye *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994; Di Lorenzo *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; França-Silva *et al.*, 2005) além de associarem ainda com a abundância vetorial (Vieira e Coelho, 1998).

Os cães infectados apresentam um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios graves da doença (Costa *et al.*, 1999). O quadro clínico da doença caracteriza-se por emagrecimento, eriçamento e queda de pêlos, nódulos ou ulcerações (mais freqüentes nos bordos das orelhas), hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia. Pode evoluir para morte, nos casos mais graves (Feitosa *et al.*, 2000). Na saúde pública, como os cães não respondem ao tratamento como os humanos, preconiza-se a eutanásia dos animais infectados.

O reconhecimento das manifestações clínicas destes reservatórios é importante para adoção de medidas de controle da doença. Os canídeos apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do flebotomíneo, e por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia epidemiológica (Brasil, 2005b). É preciso investigar a real prevalência da infecção nos cães domésticos e as espécies de *Leishmania* circulantes nesses animais e as características peculiares de cada área de transmissão (Dantas-Torres, 2006).

O homem também pode ser fonte de infecção, principalmente quando a doença incide sob a forma de epidemia e a possibilidade de que o homem, principalmente crianças desnutridas, venham, em alguns casos a ser fonte de infecção pode conduzir a um aumento na complexidade da transmissão da LV (Gontijo e Melo, 2004). O papel do homem como um importante reservatório para a LV foi proposto por Deane e Deane (1955a; 1955b), Badaró *et al.* (1994) e Oliveira e Araújo (2003). Vários estudos demonstraram a existência de parasitemia por *Leishmania* em pessoas doadoras de sangue assintomáticas em zonas endêmicas (Choi e Lerner, 2001) e foram detectados parasitos no sangue periférico (Dedet e Pratlong, 2003) e na pele (Molina *et al.*, 2003) de doentes imunocomprometidos coinfectados por *Leishmania*/HIV, com risco de instalação do ciclo antroponótico.

1.4 Vetores da LV

A transmissão do parasito ocorre pela picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera, pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Os flebotomíneos são pequenos, pilosos, de cor palha ou castanho claro, sendo popularmente conhecidos no Brasil como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira, frebóti, etc. Em sua grande maioria, habitam as florestas, em lugares sombrios, sob folhas ou troncos das árvores e próximos a pequenas porções d'água. Algumas espécies aparecem no interior das habitações humanas ou em abrigos de animais domésticos, escondendo-se em cantos escuros, de onde saem à noite em busca de alimento e podem ser atraídos pela luz. As larvas dos flebotomíneos nunca se criam em locais inteiramente aquáticos, mas em lugares úmidos, onde a luz raramente incide, com abundante matéria orgânica que lhe sirva de nutrição (Marcondes, 2001). A capacidade de voo destes dípteros é reduzida e saltitante, e pesquisas de Casanova *et*

al. (2007b) revelaram uma média aritmética de dispersão de 78m para machos e 115m para fêmeas, estando estas capacitadas para disseminar infecções para outras áreas em curto espaço de tempo.

A principal espécie vetora da LV no Brasil é *Lutzomyia longipalpis* (Carrera, 1991; Marcondes, 2001; Lainson e Rangel, 2003), apesar de *L. cruzi* apresentar evidência epidemiológica de transmissão de LV no estado de Mato Grosso do Sul (Santos *et al.*, 1998) tendo sido encontradas fêmeas naturalmente infectadas no município de Jaciara, no estado de Mato Grosso (Missawa *et al.*, 2006). As espécies *L. forattini* e *L. almerioi* podem estar relacionadas com a doença em Mato Grosso do Sul (Galati *et al.*, 1997; Maciel, 2005) e *L. antunesi* é considerado vetor alternativo no estado do Pará (Lainson e Rangel, 2003; Maciel, 2005). Na Colômbia, *L. evansi* foi incriminado como possível vetor da doença (Travi *et al.*, 1990).

Em revisão bibliográfica, Bauzer *et al.* (2007) reforçam a idéia de que *L. longipalpis* seja um complexo de espécies no Brasil, e Souza *et al.* (2007c) indicaram um alto grau de isolamento reprodutivo entre populações alopátricas de Natal, Jacobina e da Lapinha, bem como entre as populações simpátricas de Sobral, reforçando a posição de *L. longipalpis* como um complexo de espécies.

As alterações ambientais ocasionadas pelo homem e como consequência, a dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação a esses insetos, causam a adaptação de muitas espécies a diferentes ambientes (Gomes *et al.*, 1989). A proximidade do homem em zonas de floresta e a criação de animais domésticos atraem um grande número de espécies de flebotomíneos ao peridomicílio. Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um perigo constante como vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos (Vexenat *et al.*, 1986; Barbosa *et al.*, 1999; Brasil, 2003).

A domiciliação de algumas espécies origina-se como consequência de alterações antrópicas provocadas no ambiente natural. O desequilíbrio daí resultante estimula o aparecimento e desenvolvimento dessas adaptações. O fenômeno da domiciliação compreende ampla gama de espécies que se adaptam de tal maneira ao convívio humano que dele se tornaram dependentes, a ponto de viverem muito próximos ao meio antrópico. Assim

sendo, a dinâmica das comunidades estabelecidas no meio antrópico refletem os aspectos epidemiológicos próprios das doenças que delas resultam.

Algumas espécies adaptam-se ao intra ou peridomicílio, sendo comum capturá-las nas casas, no galinheiro, chiqueiro, canil, lixo, paiol, grutas e outros locais. Margonari (2005) e Carvalho (2006) observaram que os machos representaram a maioria dos flebotomos capturados em Belo Horizonte/MG e Santa Luzia/MG respectivamente, com predominância no peridomicílio. A maior quantidade de machos capturados pode ser explicada pelo fato de serem atraídos para as armadilhas quando acompanham às fêmeas para a cópula, formando os agregados para o acasalamento (Feliciangeli, 1987).

L. longipalpis foi a espécie mais abundante capturada em Porteirinha/MG (Barata *et al.*, 2004; Barata *et al.*, 2005) e em Belo Horizonte/MG, onde a espécie pareceu produzir quatro gerações por ano, com cerca de três meses de intervalo entre as gerações (Resende *et al.*, 2006). Michalsky (2004) reforça a adaptabilidade de *L. longipalpis* a ambientes domésticos, após observação de exemplares no intra e no peridomicílio em todos os meses pesquisados.

1.4.1 Influência dos fatores ambientais sobre a ocorrência e densidade de flebotomíneos

A maioria dos fatores ambientais que afetam a epidemiologia das leishmanioses sugere que alguns dos parasitos e seus vetores podem adaptar-se às alterações ecológicas como os desflorestamentos e a urbanização. Como estes parasitos e vetores adaptam-se às condições ambientais modificadas, a epidemiologia da doença associada a eles também sofre mudança (Grimaldi-Jr. e Tesh, 1993; Marzochi e Marzochi, 1994).

As mudanças do tamanho da população de vetores, de acordo com o suceder das estações do ano, são significativamente controladas por fatores ambientais que variam com igual ritmo, como as condições climáticas e as decorrentes disponibilidades de alimentos e de recursos. A existência dessa variação sazonal em populações vetorais traz, em decorrência, aspecto equivalente na incidência das doenças por elas veiculadas. Compreende-se que tais fenômenos adquiram particular interesse nos estudos epidemiológicos, objetivando o controle e a vigilância dessas infecções (Forattini, 2004).

Os habitats naturais dos flebotomíneos caracterizam-se por possuírem uma variação na temperatura e umidade, o que favorece a presença desses insetos, já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação. Uma pequena variação desses fatores nos microhabitats é suficiente para alterar a dinâmica das populações de flebotomíneos (Dias *et al.*, 2007a).

Vários trabalhos sugerem que fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação possam estar relacionados em diferentes graus com a ocorrência e densidade de flebotomíneos. A chuva pode afetar a vegetação, a temperatura, a umidade relativa do ar, o balanço hídrico, o reservatório e o vetor. Portanto, aparentemente, a precipitação anual é uma importante variável que afeta a ocorrência do vetor e a incidência da LV (Elnaiem *et al.*, 2003). Barata (2005) mostrou uma correlação estatisticamente significativa entre o número de flebotomíneos capturados, a pluviosidade e a umidade, entretanto a temperatura não teve efeito significativo sobre a dinâmica desses insetos em Porteirinha/MG, embora França-Silva *et al.* (2005) tenham observado uma associação significativa apenas entre a variável precipitação e a densidade de *L. longipalpis*, não sendo verificada relação da densidade vetorial com a umidade relativa e a temperatura no mesmo município.

Feliciangeli (1987) demonstrou que níveis de pluviosidade e a conseqüente umidade relativa do ar foram as variáveis mais importantes na sazonalidade dos flebotomíneos em um foco endêmico de leishmaniose cutânea na Venezuela. Em outros estudos, observou-se o aumento significativo da densidade populacional de *L. intermedia* (Souza *et al.*, 2002; Meneses *et al.*, 2002) e *L. migonei* (Meneses *et al.*, 2002) durante as estações mais quentes do ano e decréscimo nas estações frias, demonstrando íntima correlação com a temperatura e a umidade. Em Belo Horizonte/MG, foi observado que os maiores números de flebotomíneos capturados, incluindo *L. longipalpis*, ocorreram no período de altas precipitações combinadas com altas médias de temperatura (Resende *et al.*, 2006). É importante ressaltar que, segundo De Marco (2001), o excesso de chuvas representaria um risco físico para algumas espécies de flebotomíneos que necessitem de ambientes mais saturados de umidade para a sua sobrevivência, pois a inundação do solo destruiria os criadouros e mataria as pupas.

Scorza (1972) na Venezuela e Condino *et al.* (1998) em Teodoro Sampaio/SP, não encontraram correlação entre o número de flebotomíneos coletados e os fatores ambientais

como luminosidade, temperatura, precipitação, umidade e vento. A ausência de correlação estatisticamente significativa entre a fauna flebotomínica e os fatores climáticos foi também observada por Rebêlo (2001), Souza *et al.* (2004), Margonari (2005) e Carvalho (2006), embora tenham verificado alguns picos da densidade de flebotomíneos nos meses mais úmidos.

Gebre-Michael *et al.* (2004) além de demonstrarem o grau de associação entre LV e as variáveis altitude, temperatura e vegetação, construíram um mapa que determina o risco de transmissão da doença em determinadas regiões da Etiópia, Kênia e Somália.

1.4.2 Preferência alimentar e conteúdo intestinal de flebotomíneos

O estudo do comportamento alimentar e do conteúdo intestinal dos flebotomíneos permite a identificação dos hospedeiros, indicando os potenciais reservatórios das leishmanias. Em condições ambientais favoráveis, determinadas espécies de flebotomíneos podem alterar seu ritmo nictemeral, ou seja, o horário em que estas se tornam ativas e prontas para exercerem a hematofagia. Quanto ao horário de hematofagia, por sua natureza bionômica, esses insetos têm hábitos hematofágicos diurnos, noturnos ou indiferentes e podem ser capturados em diferentes horas do dia ou da noite ou até 24 horas ininterruptamente, mas apresentam preferência entre o entardecer e o amanhecer (Marcondes, 2001). Alimentam-se de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre eles o homem (Monteiro *et al.*, 2005).

Quinnell *et al.* (1992) em experimentos de campo na Ilha de Marajó/PA, demonstraram que fêmeas de *L. longipalpis* são mais atraídas por iscas humanas que por cães e galinhas. Resultado similar foi observado por Campbell-Lendrum *et al.* (1999) para *L. longipalpis* na Amazônia. Ximenes *et al.* (1999), demonstrando a densidade de flebotomíneos em abrigos de animais domésticos e silvestres no estado do Rio Grande do Norte, observaram que *L. longipalpis* se mostrou eclética, alimentando-se de cavalos, tatus, galinhas e preás em ordem decrescente e alimentu-se preferencialmente em aves na pesquisa realizada na Serra da Bodoquena/MS (Marassá *et al.*, 2006).

Os testes de preferência alimentar com utilização de diversos anti-soros mostraram que fêmeas de *L. longipalpis* são bastante oportunistas, podendo sugar uma ampla variedade de vertebrados, mas preferencialmente galinhas e cavalos seguidos por roedores, cães, bois e homem (Barata, 2005). No ambiente peridomiciliar, muitos focos de flebotomíneos são mantidos próximos a galinheiros, onde as aves tornam-se alvos de repastos sanguíneos consecutivos, mantendo-se aí o ciclo do inseto (Andrade, 2006). Afonso *et al.* (2005) realizaram pesquisa de fonte alimentar em *L. intermedia* no ambiente intra e peridomiciliar em Mesquita/RJ, confirmando a antropofilia nos dois ambientes pesquisados, sendo este um fator essencial na avaliação da capacidade vetorial do inseto.

A pesquisa entomológica é pré-requisito para a aplicação de medidas preventivas que compreendem um amplo campo de pesquisa que pode depreender esclarecimentos acerca da gênese da doença ou agravo. O conhecimento dos hábitos alimentares de espécies de flebotomíneos e de suas fontes sanguíneas tem sido muito útil no aperfeiçoamento dos conhecimentos sobre a epidemiologia das leishmanioses e, neste sentido, tem norteado as atividades de controle e vigilância, pois ajuda a entender como cada espécie interage com o seu hábitat e como ocorre a transmissão da LV em determinada área.

1.5 Estudo molecular para detecção de infecção por *Leishmania* spp.

Apesar do importante papel das leishmanias nas doenças tropicais, o conhecimento atual a respeito da infecção natural de flebotomíneos coletados em áreas endêmicas é insuficiente para o diagnóstico parasitológico convencional, e pouco foi realizado utilizando-se ferramentas moleculares (De Pita-Pereira *et al.*, 2005). Os métodos mais utilizados para detecção de infecção são o parasitológico após dissecação do trato digestivo do inseto vetor, devendo ser confirmada pela cultura do parasito ou inoculação em animais de laboratório. Porém, a pesquisa de flagelados nesses vetores tem se mostrado operacionalmente inadequada e com baixa especificidade do diagnóstico, pois fêmeas de flebotomíneos também podem albergar outros flagelados como *Trypanosoma* e *Endotrypanum* (Paiva *et al.*, 2007). O desenvolvimento de novas técnicas fundamentadas na genética, na bioquímica e na imunologia contribuíram para a caracterização molecular de parasitos, permitindo desenvolver estudos de taxonomia e epidemiologia molecular dos organismos (Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi-Jr. *et al.*, 1989; Grimaldi-Jr. e Tesh, 1993).

Os métodos moleculares apresentam vantagens de sensibilidade, especificidade e considerável redução de tempo, independentemente do número, estágio e localização da *Leishmania* em amostras clínicas de reservatórios e de vetores infectados (De Bruijn e Barker, 1992; Perez *et al.*, 1994; Minodier *et al.*, 1997; Michalsky *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2002; Weigle *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003; De Pita-Pereira *et al.*, 2005). Os protocolos podem utilizar iniciadores dirigidos a regiões conservadas (Smyth *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1994; Belli *et al.*, 1998; Brecej *et al.*, 2000) e variáveis dos minicírculos do kDNA (Hernandez-Montes *et al.*, 1998; Sanchez-Tejeda *et al.*, 2001; Weigle *et al.*, 2002). O controle interno da extração de DNA e da reação de PCR pode ser realizado a partir da utilização de iniciadores para amplificar o gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos (De Pita-Pereira *et al.*, 2005).

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

Rodgers *et al.* (1990) foram os pioneiros na utilização da técnica de PCR na detecção de DNA de *Leishmania* tendo como alvo as moléculas de minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA). Esses autores demonstraram a sensibilidade do método capaz de detectar uma única forma amastigota de *L. (V.) braziliensis* e até 1% do kDNA de uma amastigota de *L. (L.) mexicana*. Segundo Aransay *et al.* (2000), o minicírculo do kDNA é um marcador ideal, pois está presente em 10.000 cópias por célula e esta seqüência é conhecida na maioria das espécies de *Leishmania*. A técnica também foi utilizada por Perez *et al.* (1994), Rodriguez *et al.* (1999), Miranda *et al.* (2002), De Pita-Pereira *et al.* (2005), Oliveira-Pereira *et al.* (2006) e Galati *et al.* (2006) em flebotomíneos naturalmente infectados. Michalsky *et al.* (2002) e Paiva *et al.* (2007) avaliaram a utilização da técnica em flebotomíneos experimentalmente infectados.

Paiva-Cavalcanti *et al.* (2007) avaliaram a utilização de PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, sugerindo este sistema para se estimar a

carga parasitária de amostras de pacientes humanos e cães com LV e, Gomes *et al.* (2007) afirmaram que a PCR é altamente sensível e específica para o diagnóstico da LV humana.

A confirmação da espécie de *Leishmania* presente no trato digestivo do inseto vetor pode ser realizada por PCR-RFLP, utilizando-se a endonuclease HaeIII que digere o fragmento produto de PCR de 120 pb de *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, um de 80 pb e outro de 40 pb; mas não digere o produto amplificado de *L. (L.) amazonensis* (Volpini *et al.*, 2004). A digestão do produto amplificado de *L. (L.) infantum chagasi* produz bandas com 120, 80, 60 e 40 pbs usando-se a mesma enzima (Andrade *et al.*, 2006).

A identificação da espécie de *Leishmania* causadora da leishmaniose tegumentar americana (LTA) por PCR-RFLP foi realizada por Volpini *et al.* (2004), sugerindo este como método alternativo para detecção de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) amazonensis* em áreas endêmicas. Paiva *et al.* (2004) utilizaram a PCR para distinguir os subgêneros *Viannia* de *Leishmania* e Andrade *et al.* (2006) utilizaram iniciadores específicos para diferenciar os complexos *mexicana* e *braziliensis*. Quaresma (2006), Andrade *et al.* (2005b) e Andrade *et al.* (2006) utilizaram a técnica para a diferenciação das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* em amostras de cães infectados. Santiago e Lima (2007), Viana *et al.* (2007), Kerr *et al.* (1995) e Costa (2002) realizaram estudos de infecção de roedores por *Leishmania*, cujos isolados obtidos foram caracterizados por análise de isoenzimas e PCR. Ferreira *et al.* (2007) investigaram a presença de *Leishmania* por PCR em mamíferos domésticos, sinantrópicos e silvestres e seus respectivos ectoparasitos.

1.6 Vigilância epidemiológica, prevenção e controle da LV

A vigilância epidemiológica adota as medidas preventivas que pressupõem a instalação, e subsequente atividade continuada de sistema que se encarregue de avaliar os resultados, como mecanismo que permita acompanhar seguidamente o estado de saúde populacional, em relação ao ou aos agravos que foram e são objeto de prevenção. A prevenção é conhecida como promoção à saúde, cujo objetivo primordial é o de modificar as condições de maneira a torná-las pouco propícias para o aparecimento da doença, ou seja, procura-se evitar a exposição do conjunto populacional ao estímulo desencadeante. Um entendimento da interação entre as mudanças ambientais urbanas, cães infectados e

flebotomíneos vetores é um pré-requisito para a projeção de estratégias apropriadas de medidas de controle e prevenção das leishmanioses (Costa *et al.*, 1999). O Brasil é o único país endêmico para a LV que regularmente conduz programa epidemiológico e profilático no combate à doença de caráter nacional (Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001).

A descrição do potencial de transmissão das leishmanioses e a sua distribuição dependem da densidade dos vetores que está diretamente relacionada à biogeografia e ao clima das regiões (Ferreira *et al.*, 2001; Elnaiem *et al.*, 2003). Bejarano *et al.* (2002) propuseram um programa de controle dedicado à vigilância epidemiológica, em função das mudanças de comportamento das espécies de flebotomíneos frente às mudanças ambientais causadas pelo homem. Alvar *et al.* (1994) e Teodoro *et al.* (2003) recomendaram ainda, evitar o acúmulo de lixo e matéria orgânica em decomposição, que favorecem o ciclo biológico do inseto.

As medidas gerais de controle para a LV, devido a sua enorme complexidade, devem ser divididas em várias frentes de ações relacionadas com os humanos, ao inseto vetor e aos reservatórios domésticos e situações são especialmente definidas para cada local e as medidas de controle devem ser flexíveis e designadas especialmente para cada região (Marzochi, 1992).

Algumas medidas integradas como o controle da leishmaniose canina, o conhecimento da variação sazonal e controle de flebotomíneos, a identificação e tratamento dos focos de infecção em áreas recentes ou estabelecidas de colonização e os conhecimentos acerca da distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* têm um impacto significativo na redução de casos humanos (Alencar, 1961; Sherlock e Almeida, 1970; Dye *et al.*, 1993; Brandão-Filho e Shaw, 1994; Ferreira *et al.*, 2001; De Pita-Pereira *et al.*, 2005).

A OMS recomenda o tratamento dos casos humanos, controle químico do vetor e o sacrifício de cães soropositivos (Tesh, 1995; Brasil, 2003), embora modelos matemáticos referentes aos métodos de controle tenham sugerido que o sacrifício de cães sorologicamente positivos seja muito menos provável de resolver o problema da LV que a borrifação com inseticida para o controle dos vetores (Dye, 1996).

No ambiente doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle, podendo citar as coleiras impregnadas com deltametrina, de efeito repelente para o vetor, têm demonstrado resultados promissores, pois não existe tratamento eficaz ou profilático para o cão infectado (Lainson e Rangel, 2003; Gontijo e Melo, 2004). As metodologias utilizadas para a seleção dos cães a serem eliminados se baseiam no diagnóstico por técnicas sorológicas, a imunoadsorção enzimática (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) que apresentam baixa sensibilidade e especificidade, podendo acarretar taxas de infecções subestimadas, permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas (De Paula *et al.*, 2003). A adoção do teste ELISA na rotina diagnóstica da LV canina é uma recomendação válida com vistas à otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em áreas de ocorrência endêmica (Oliveira *et al.*, 2005) e a RIFI é considerada padrão ouro pela OMS, além de ser o teste de escolha para inquéritos populacionais (Amóra *et al.*, 2006).

Segundo Dye (1996), na reposição imediata pela população após a eliminação, os novos cães tornam-se infectados em aproximadamente dois meses. Apesar das ações sobre os cães como reservatórios serem bastante discutidas, os demais reservatórios domésticos e os silvestres como os ratos e os gambás, são esquecidos, sendo uma sugestão de Margonari (2005) que estudos nesse sentido sejam planejados e executados.

Ximenes *et al.* (1999), Gontijo e Melo (2004) e Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) destacam a importância do conhecimento do comportamento do inseto vetor em áreas endêmicas, o tratamento precoce dos casos humanos e a redução do contato humano com os vetores, além de uma melhor definição das áreas prioritárias para o controle. Embora a abordagem atual do programa de controle da LV permita uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco e propõe ações de vigilância para os municípios considerados silenciosos (Brasil, 2003). Deve-se levar em conta ainda, a descentralização das ações de controle dessas doenças para os municípios (Tauil, 2006).

Segundo Camargo e Langoni (2006), os métodos utilizados até o presente momento têm sido parcialmente efetivos na prevenção e controle da doença e Gontijo e Melo (2004) afirmam que as medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias, pois essas ações foram

sempre descontínuas por diversas razões, como problemas orçamentários e escassez de recursos humanos adequadamente treinados. As estratégias de controle atuais não têm sido capazes de prevenir a expansão geográfica, além do aumento da incidência e da letalidade da LV (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). Para um controle mais efetivo, há necessidade de determinação política, ações multi-setoriais e uso racional de inseticida (Tauli, 2006).

Alves *et al.* (2007) em análise dos atributos qualitativos e quantitativos do sistema de vigilância epidemiológica da LV, concluíram que o mesmo permite detectar epidemias, entender características clínicas identificando possíveis mudanças e estimar a morbidade e mostrasse ineficiente para estimar a mortalidade e avaliar ações de prevenção e controle da LV.

Ações de educação e saúde e participação da comunidade constituem fatores fundamentais nos programas de controle. A educação sanitária deve ser amplamente divulgada, motivando a população a adotar atitudes de conhecimento e sensibilização sobre a transmissão da doença, principais causas e sintomatologias. A população deve ainda, diante do reconhecimento dos sintomas da doença, humana ou canina, procurar órgãos de saúde competentes para as devidas providências, apoiando ainda, as atividades anti-vetoriais que estejam sendo implementadas (Monteiro *et al.*, 1994).

1.7 Situação da LV no estado de Mato Grosso

No ano de 1973, oito casos de LV humana autóctones foram relatados em Mato Grosso, no município de Guiratinga (Baruffa e Cury, 1973). Entre os anos de 1992 e 1994 foram diagnosticados 39 casos no Estado (Hueb *et al.*, 1996), com 35 casos originados no município de Várzea Grande e, posteriormente estendendo-se a outras regiões (Camiá *et al.*, 1999). Estudos sorológicos de leishmaniose canina foram realizados no município de Cuiabá, por Gaspar *et al.* (2005) e Moura *et al.* (1999) que diagnosticaram uma positividade de 64,5% para leishmaniose.

Ribeiro *et al.* (2002) realizaram um inventário dos vetores das leishmanioses na área de Aproveitamento Múltiplo de Manso (APM-Manso) que engloba os municípios de Chapada dos Guimarães, Nobres, Rosário Oeste e Nova Brasilândia, observando a presença de *L.*

longipalpis e *L. cruzi* na região, destacando o processo de domiciliação das espécies. Missawa e Lima (2004) discutiram a abundância de *L. longipalpis* em Nossa Senhora do Livramento. Em estudo no norte do Estado, Azevedo *et al.* (2002) e De Luca *et al.* (2003) não observaram a presença de *L. longipalpis* em Peixoto de Azevedo e Alta Floresta, respectivamente. Ribeiro e Missawa (2002) estudaram a distribuição espacial de flebotomíneos e a relação da ocorrência das espécies com os diferentes ecossistemas do Estado. Missawa e Lima (2006) estudaram a distribuição espacial de *L. longipalpis* e *L. cruzi* em Mato Grosso e os biomas preferenciais de cada espécie para indicar áreas vulneráveis e/ou receptivas para a transmissão da doença e Ribeiro *et al.* (2007) estudaram a distribuição de flebotomíneos vetores no Estado.

Tonello *et al.* (2005) descreveram a situação da LV em Mato Grosso e sua rápida expansão, sendo que a Secretaria Estadual de Saúde vem trabalhando no sentido de dar mais atenção ao agravo. Segundo Maciel (2005), entre os anos de 2001 a 2003 houve uma progressiva evolução das informações e uma significativa redução dos casos humanos.

Oliveira *et al.* (2003) correlacionaram a ocorrência de casos humanos de leishmanioses com a implantação de projetos agropecuários, abertura de estradas e o assentamento de trabalhadores rurais sem-terra, sem preocupação com infra-estrutura sanitária, situação sócio-econômica comum no estado de Mato Grosso. Ashford (2000) relaciona a infecção humana às relações ecológicas entre as atividades antrópicas e do reservatório.

Mestre (2006) e Mestre e Fontes (2007) descreveram a expansão da epidemia de LV em Mato Grosso e revelaram que no período compreendido entre janeiro de 1998 e dezembro de 2005, ocorreram 138 novos casos de LV humana registrados, que pode ter sido facilitada pela grande rede de estradas vicinais presentes na região sudeste do Estado, contribuindo para o estabelecimento de correntes migratórias, disseminando a transmissão para o interior do Estado, resultando em coeficiente de incidência acumulada de 5,4 casos/100.000 habitantes e letalidade de 11,6%.

1.8 Situação da LV no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso

O primeiro caso de LV em um paciente procedente do município de Várzea Grande foi diagnosticado em janeiro de 1988 (Hueb *et al.*, 2000). Segundo trabalho de Ribeiro *et al.* (2000) em coleta entomológica realizada nos bairros Jardim Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, a espécie mais abundante foi *L. longipalpis*, perfazendo um total de 96,4% do total das espécies coletadas, com preferência por galinhas, evidenciando uma adaptação desses insetos ao ambiente peridomiciliar. No mesmo município, foram pesquisados 27 bairros no ano de 2001, sendo constatadas altas densidades de *L. longipalpis* nos ambientes intra, peri e extradomiciliar. O vetor *L. longipalpis* apresentou alta densidade no peridomicílio do bairro Eldorado. Esses dados do ambiente peridomiciliar contribuem com as informações da literatura, pois segundo Marcondes (2001), o flebotomíneo é mais encontrado próximo às casas, em lugares úmidos, escuros, onde tem muita vegetação, local esse ideal para sua procriação.

Mestre (2001) relatou a expansão da doença entre os anos de 1998 e 2000 em Várzea Grande, a partir de focos urbanos periféricos, associados às precárias condições econômicas e sociais das comunidades afetadas, destacando os bairros São Matheus e Jardim Eldorado como umas das prováveis portas de entrada da doença no município que apresentou no período, elevada densidade de *L. longipalpis* e 6% de positividade nos testes sorológicos caninos realizados. Segundo o autor, o registro de 13 casos humanos, todos autóctones e procedentes de Várzea Grande, deram início à epidemia de LV em Mato Grosso no ano de 1998.

Em pesquisa entomológica realizada em dezembro de 2002, verificou-se a ocorrência de alta densidade de *L. longipalpis* no peridomicílio do bairro São Matheus, evidenciando o risco de transmissão de LV para a população da área. Missawa e Lima (2005) destacaram a grande densidade de *L. longipalpis* em vários bairros do município de Várzea Grande. A fauna flebotomínica do município foi estudada por Missawa (2006) e Missawa e Dias (2006) que observaram grandes densidades de *L. longipalpis*, principalmente machos e no peridomicílio.

Devido à ocorrência do vetor *L. longipalpis* e a prevalência de LV no município de Várzea Grande, a presença de cães, principal reservatório doméstico da *L. (L.) infantum*

chagasi, além da carência de trabalhos sobre o conhecimento da ecologia e distribuição sazonal desses vetores, fazem-se necessárias investigações entomo-epidemiológicas para que sejam delineadas as ações de controle da doença no estado de Mato Grosso.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses vêm se destacando nos últimos anos, no contexto da saúde pública, devido a sua urbanização, caracterizada pela rápida expansão geográfica e reemergência em focos endêmicos antigos, sendo os casos humanos frequentemente associados à pressão antrópica sobre o meio ambiente e a expansão da LV pode estar intimamente ligada a alguns locais com características rurais (Cesse *et al.*, 2001).

No estado de Mato Grosso ocorreram 138 casos de LV humana no período de 1998 a 2005 e, no mesmo período foram avaliados 40.000 cães, resultando em 9% de soropositividade para a LV canina e presença de vetores da *L. (L.) infantum chagasi* foi observada em 14 dos 141 municípios do Estado (Mestre, 2006; Mestre e Fontes, 2007).

A magnitude da epidemia fez com que o município de Várzea Grande/MT fosse classificado em 2002 e 2003, pelo Departamento de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), como área de transmissão intensa de LV no Brasil, juntamente com os municípios de Campo Grande e Corumbá/MS, Palmas/TO, Araçatuba/SP, Belo Horizonte e Montes Claros/MG, São Luís/MA e Teresina/PI (Brasil, 2003) e foi reclassificado como de transmissão moderada em 2004 e área de transmissão esporádica em 2005 e 2006, conforme média de casos dos últimos cinco anos.

O aumento da densidade do vetor, o convívio muito próximo do homem com o reservatório doméstico, o desmatamento acentuado e a constante mobilização de pessoas constituem as principais determinantes dos níveis epidêmicos da LV nos grandes centros urbanos (Marzochi e Marzochi, 1997).

O êxodo rural e o intenso fluxo migratório ocorrido nas últimas décadas no estado de Mato Grosso, também promoveram o crescimento desordenado de cidades como Cuiabá e Várzea Grande (Piaia, 2003) e, certamente contribuíram para o surgimento da atual epidemia de LV, pois segundo Mestre (2006), a pobreza, a desnutrição e a alta densidade de flebotomíneos tanto no intra quanto no peridomicílio, associada à elevada presença de animais domésticos, destruição de ecótopos silvestres, precárias condições de moradia, péssimas

condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico representam um panorama do município de Várzea Grande.

Os bairros São Matheus e Jardim Eldorado, situados em uma mesma faixa periurbana do município de Várzea Grande, foram os mais atingidos pela LV e representaram, no início da epidemia, áreas de degradação ambiental provocadas pela ocupação desordenada de famílias de baixa renda, popularmente conhecidas como áreas de invasão ou *grilo* (Mestre e Fontes, 2007).

O conhecimento da densidade e da sazonalidade de flebotomíneos são importantes para o delineamento das ações de controle da doença, visando minimizar gastos com recursos humanos e insumos. Os estudos de endofilia e exofilia são importantes para detectar a presença dos flebotomíneos no ambiente intradomiciliar, alimentando-se de sangue humano, ou no ambiente peridomiciliar, atraídos por animais domésticos e silvestres, e sua relação com o risco de transmissão da LV.

O estudo do conteúdo intestinal de insetos hematófagos é de grande significado ecológico e epidemiológico, permitindo descobrir a identidade dos hospedeiros sobre os quais os flebotomíneos se alimentam, fornecendo subsídios para identificar os potenciais reservatórios e as respectivas estratégias de controle (Ferreira, 1945; Boreham, 1975; Tempelis, 1975; Ngumbi *et al*, 1992; Barata, 2005).

Segundo Michalsky *et al.* (2002), a determinação da taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação da espécie de *Leishmania* infectante são de extrema importância nos estudos vetoriais e epidemiológicos das leishmanioses.

Considerando-se que o município Várzea Grande no estado de Mato Grosso apresenta casos humanos de LV em área urbana e periurbana, e condições para expansão de LV como alta densidade de flebotomíneos, principalmente o vetor *L. longipalpis* e cães com sorologia positiva para LV, além da carência de dados acerca da doença, do vetor, do parasito e dos reservatórios, tornam-se necessários estudos para o conhecimento dos aspectos envolvidos na transmissão da doença e conseqüentemente, para a promoção de estratégias de controle.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Conhecer alguns aspectos ecológicos que influenciam a fauna flebotomínica, a densidade, a flutuação sazonal, a preferência alimentar, infecção natural dos flebótomos, em área de transmissão de LV no município de Várzea Grande, Mato Grosso.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies que compõem a fauna de flebotomíneos em área de transmissão de LV no município de Várzea Grande;
- Determinar a densidade e a distribuição sazonal dos flebotomíneos na área de estudo;
- Determinar a endofilia e a exofilia dos flebotomíneos;
- Correlacionar os dados vetoriais com ocorrência de casos humanos de LV e com a soropositividade canina no mesmo período;
- Determinar a taxa mínima de infecção natural de *L. longipalpis* por *L. (L.) infantum chagasi*;
- Determinar a preferência alimentar de *L. longipalpis* e sua relação com a transmissão de LV.
- Sugerir medidas de controle mecânico e químico a serem realizadas pela Secretaria Municipal de Saúde do município de Várzea Grande;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Várzea Grande é conhecido como a cidade industrial do estado de Mato Grosso (Figura 1), possui 106 bairros e população de 214.842 habitantes, com 210.849 residentes na zona urbana e 3.993 na zona rural (IBGE, 2000 *apud* Ferreira, 2001) e compõe, juntamente com a capital Cuiabá, o chamado Conglomerado Urbano de Cuiabá ou Região Metropolitana de Cuiabá.

Com extensão territorial de 949,53km² e altitude de 185m, Várzea Grande tem como referências geográficas as coordenadas 15°32'30" latitude sul e 56°17'18" longitude oeste. Geograficamente localiza-se na Mesorregião Centro-sul do estado de Mato Grosso, microrregião Cuiabá e possui clima tropical quente e sub-úmido e precipitações de 1750 mm anuais. As chuvas se concentram de setembro a abril, com maior intensidade em janeiro, fevereiro e março, nos outros meses, as massas de ar seco sobre o centro do Brasil inibem as formações chuvosas, quando é comum a chegada de frentes frias vindas do sul do país, deixando o clima mais ameno e úmido. Quando essas frentes se dissipam, o calor, associado à fumaça produzida pelas constantes queimadas, faz a umidade relativa do ar cair a níveis baixos, às vezes abaixo dos 15%. A temperatura média anual é de 24°C, a máxima média chega a 34,1°C, mas as máximas absolutas chegam a mais de 42°C. A mínima média em julho, o mês mais frio, é de 16,7°C. O quadro geomorfológico do município é, em grande parte, representado pelo Planalto da Casca e pela Depressão Cuiabana. Predominam os relevos de baixa amplitude com altitudes que variam de 146 a 250 metros na área da própria cidade. A vegetação predominante no município é o cerrado, desde suas variantes mais arbustivas até as matas mais densas à beira dos cursos d'água (Piaia, 2003).

Várzea Grande é predominantemente comercial e industrial, sendo a agricultura de subsistência e a pecuária é pelo sistema de cria, recria e corte (Ferreira, 2001). Através de incentivos fiscais e doações de terras, indústrias se instalaram na região, constituindo, juntamente com a capital, o principal pólo industrial do Estado.

O município de Várzea Grande apresentou os primeiros casos de Leishmaniose Visceral Humana e Canina a partir do ano de 1998, quando se realizaram planos emergenciais com o intuito de avaliar a extensão das Leishmanioses no município e, paralelamente executando ações de controle. Dados históricos da doença foram obtidos junto à Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Várzea Grande, evidenciando a prevalência da doença nos últimos anos.

A área de transmissão localizada no setor quatro do município abrange os bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá (Figuras 2, 3 e 4). A escolha da área e das residências baseou-se em dados anteriores de pesquisa entomológica (Hueb *et al.*, 2000; Ribeiro e Missawa, 2002), prevalência da LV canina e ocorrência de casos humanos da doença.

No local foram verificados “in locu” processos que estão relacionados com a ocupação do espaço urbano e que contribuem para a ocorrência e expansão da LV, como baixa condição sócio-econômica dos moradores e residências sem saneamento básico adequado, coleta regular de lixo e rede elétrica. A observação sobre a existência de animais domésticos nas moradias confirmou que cães e galinhas estavam presentes em 100% das casas pesquisadas, seguidas por pato, peru, porco, cavalo, boi, gato e prováveis roedores e gambás no peridomicílio e nas proximidades, continuidade com áreas rurais e áreas de cerrado degradado, com ocorrência de “lixões” nos arredores dos bairros.

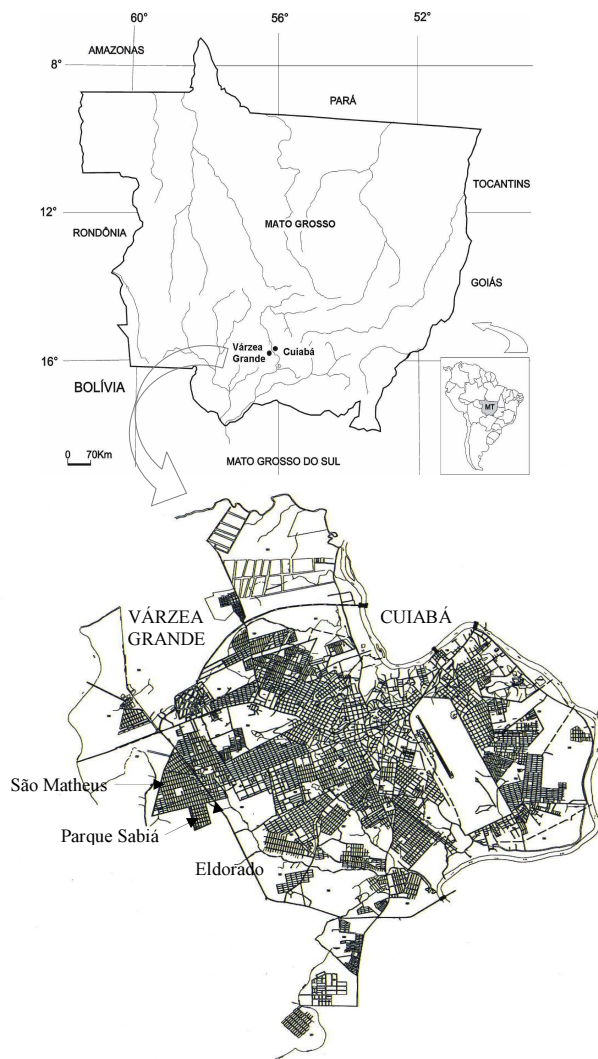


Figura 1. Área de estudo: município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.

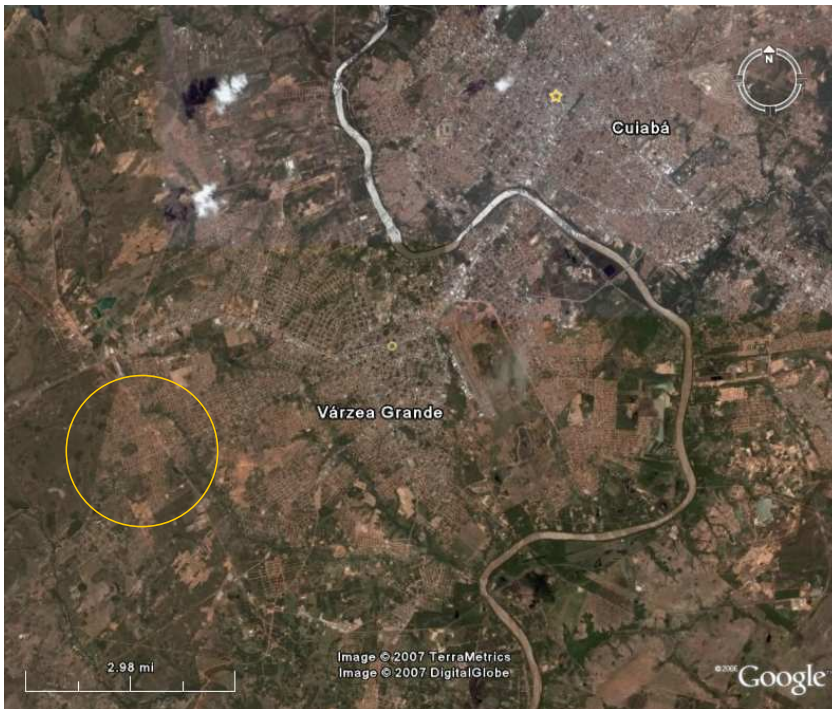


Figura 2. Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, evidenciando a área de transmissão (círculo)
(Fonte: Google Earth, 2006).



Figura 3. Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, evidenciando os bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá e os pontos de captura de flebotomíneos (enumerados de 1 a 10). (Fonte: Google Earth, 2006).

A



B



C



Figura 4. Bairros pesquisados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 (A: Eldorado, B: São Matheus, C: Parque Sabiá). (Fotos: NAM).

4.2 Métodos de captura

4.2.1 Coletas sistematizadas

As coletas sistematizadas de flebotomíneos foram realizadas no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 sempre na primeira semana de cada mês, totalizando 30 meses de capturas.

Foram utilizadas armadilhas de luz do tipo CDC – Control Disease Center, Atlanta, USA (Sudia e Chamberlain, 1962), instaladas mensalmente, durante quatro noites consecutivas, expostas no entardecer e recolhidas no amanhecer, perfazendo aproximadamente 12 horas de coleta. As coletas foram realizadas em 10 residências, sendo três residências localizadas no bairro Eldorado, quatro no bairro São Matheus e três no Parque Sabiá, localizados no distrito leste do município de Várzea Grande. Foram instaladas duas armadilhas por residência, uma no peridomicílio (quintal e/ou abrigos de animais) e a outra no

intradomicílio (quarto/dormitório) conforme Figuras 5 e 6, de maneira sistemática e de forma pareada, para fornecer subsídios para os estudos de endofilia e exofilia.

Todas as residências foram georreferenciadas através do Sistema de Posicionamento Global (GPS), com consentimento de todos os moradores para a participação e a colaboração, sendo que durante o período de estudo não foi aplicado inseticida para o controle de insetos na área pesquisada e no município como um todo.

Os insetos capturados foram sacrificados em câmara mortífera com acetato de etila. Após a triagem, os espécimes destinados à identificação taxonômica foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool a 70% e as fêmeas ingurgitadas destinadas à análise de preferência alimentar foram colocados em freezer a -7°C .

4.2.2 Coletas não sistematizadas

Coletas não sistematizadas com o objetivo de capturar exemplares fêmeas, destinadas à verificação de infecção natural, foram realizadas a princípio com a utilização de capturador manual de Castro e pesquisa por 15 minutos na parede interna e 15 minutos na parede externa dos domicílios. Como este método não obteve sucesso, uma vez que não foram capturados flebotomíneos nas paredes das residências pesquisadas, optou-se por instalar uma armadilha de CDC adicional no peridomicílio de cinco das dez casas pesquisadas, durante as quatro noites de capturas mensais, tomando o cuidado para que a luminosidade desta armadilha não interferisse na captura da outra armadilha do peridomicílio.

Os insetos capturados foram sacrificados em câmara mortífera com acetato de etila. Após a triagem e sexagem, as fêmeas destinadas à identificação para a análise molecular foram congeladas a -20°C .

A



B



Figura 5. Instalação de armadilhas de CDC no intradomicílio (A e B). Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005. (Fotos: NAM).

A



B



Figura 6. Instalação de armadilhas de CDC no peridomicílio (A e B). Município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2005. (Fotos: NAM).

4.3 Preparação e montagem dos espécimes

Os flebotomíneos, antes de serem montados em lâminas, foram preparados de acordo com técnicas padronizadas no Laboratório de Entomologia da SES, para a clarificação das estruturas internas necessárias para a identificação das espécies, principalmente das fêmeas. Antes do processo de clarificação, a conservação dos mesmos foi feita em álcool a 70%. No processo de clarificação os exemplares foram submetidos a diferentes soluções: Hidróxido de potássio 10% por 3 horas; ácido acético 10% por 20 minutos; água destilada, três séries de 15 minutos e lacto-fenol por 24 horas. Lacto-fenol (Brasil, 2005a): Fenol cristalizado (100g), ácido láctico (100g), glicerina (200ml) e água destilada (200ml).

O material preparado foi montado em líquido de Berlese, meio aquoso que possui baixa refringência e, portanto possibilita a visualização das estruturas internas com nitidez, imprescindível para a identificação de fêmeas, embora seja considerada uma montagem provisória e de curta durabilidade (Langeron, 1949 *apud* Barata, 2005). Líquido de Berlese (Brasil, 2005a): Hidrato de cloral (74g), goma arábica (8g), água destilada (10ml), xarope de glicose (5ml) e ácido acético cristalizável (3ml).

4.4 Identificação das espécies

Os espécimes foram identificados com utilização de microscópio óptico de contraste de fases Olympus CX40, segundo classificação de Young e Duncan (1994), Martins *et al.* (1978) e Forattini (1962) especificamente para o gênero *Brumptomyia*, realizadas no Laboratório de Entomologia da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso, com posterior confirmação através de descrições originais e exemplares de referência depositados na coleção de flebotomíneos do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (LALEI/CPqRR/FIOCRUZ/Belo Horizonte/MG). O material danificado foi identificado apenas ao nível genérico, sendo considerado *Lutzomyia* spp. ou *Brumptomyia* sp. Os exemplares foram depositados no Laboratório de Entomologia da Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses/ Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental/ Superintendência de Vigilância em Saúde/ Secretaria Estadual de Saúde/ Mato Grosso (GEVVAN/COVSAM/SUVSA/SES/MT).

4.5 Dados bioclimáticos

Os dados bioclimáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm³), referentes ao período do estudo foram obtidos junto ao 9º Distrito de Meteorologia do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), sediado no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso. Nesta pesquisa foram utilizados os valores das médias mensais de cada variável para o estudo da sazonalidade de flebotomíneos na área de pesquisa.

4.6 Preferência alimentar

As fêmeas ingurgitadas capturadas no campo foram congeladas a -7°C para paralisação do processo digestivo. Posteriormente foram dissecadas para triagem e confirmação da espécie *L. longipalpis*.

No teste de precipitina, realizado pelo colaborador Elias Seixas Lorosa do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), foi aplicado ao conteúdo do tubo digestivo de cada fêmea, solução salina a 0,85% e o macerado foi resfriado durante 12 horas a temperatura de 4 a 8°C. Depois de centrifugado por 5 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi confrontado com anti-soros de boi, cão, cavalo, porco, roedor, ave e homem, segundo metodologia de Lorosa e Andrade (1998).

4.7 Casos Humanos de LV

Os dados sobre o número absoluto dos casos humanos de LV ocorridos em Mato Grosso no período de janeiro de 1998 a junho de 2006 foram obtidos junto ao Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) disponibilizados pela Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica (COVEPI) da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso (SES/MT).

4.8 Inquérito Canino Amostral

As amostras para o diagnóstico da LV canina foram coletadas por agentes de saúde do município. Foram coletados 5ml de sangue por venopunção, utilizando-se o sistema vacutainer, sendo posteriormente identificadas com dados do cão e de seu proprietário. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública (MT-Laboratório) da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso (SES/MT) para triagem através da imunoabsorção enzimática (ELISA) e análise por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), como descrito por Camargo e Rebonato (1969) e preconizado pelo Ministério da Saúde (MS), sendo considerado positivo o soro que apresentou reação em diluição igual ou superior ao ponto de corte de 1:40. A média da prevalência de LV canina foi calculada como a razão entre o número de exames positivos e exames realizados e multiplicados por 100.

Após o diagnóstico, os cães soropositivos foram recolhidos e eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Várzea Grande, de acordo com técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde.

4.9 Extração de DNA de *Leishmania* sp.

As fêmeas de *L. longipalpis*, anteriormente dissecadas para a confirmação da espécie, foram colocadas em “pool” de 10 indivíduos em tubo de microcentrifuga. O isolamento do DNA foi realizado conforme Souza *et al.* (2004) e Michalsky *et al.* (2002), através da maceração dos exemplares a seco (sob gelo), utilizando-se um pistilo plástico autoclavado. Adicionaram-se 50,0µl de tampão de lise celular (100mM Tris-HCL, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8,0), seguido de nova maceração. As amostras foram digeridas a 37°C durante a noite pela adição de 1,0µl de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (10mg/ml).

Para a extração com fenol-clorofórmio (Ausubel *et al.*, 1992), após a incubação, acrescentou-se 70µl de água Milli Q® (Millipore, Billerica, MA, US) estéril e 120µl de fenol saturado em tampão e foi homogeneizada vigorosamente utilizando-se um vórtex por 20 segundos e centrifugada a 14.000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrifuga, extraiu-se novamente com o

fenol, repetindo-se o processo anterior. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo de microcentrifuga e adicionaram-se 120µl de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) e foi centrifugado por cinco minutos a 14.000rpm. Repetiu-se a extração com clorofórmio/ álcool isoamílico.

Após adição de 20µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200µl de etanol absoluto gelado, as amostras foram colocadas a -20°C durante a noite, para precipitação do pellet.

Após centrifugar por 30 minutos a 14.000rpm em centrífuga refrigerada (4°C), o sobrenadante foi desprezado, inclinando-se o tubo de microcentrifuga de uma só vez. O DNA sedimentado foi lavado com 100µl de etanol 70% gelado e centrifugado por 15 minutos a 14.000rpm em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente para não deslocar o pellet e o tubo de microcentrifuga foi invertido sobre papel absorvente para a secagem do DNA.

Para dissolver o DNA adicionou-se 30µl de solução de hidratação TE 1x (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA). A pureza e a concentração foram estimadas em espectrofotômetro Bio Photometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech) a 260 e 280nm.

As amostras de DNA estoque e diluídas (1+4) foram acondicionadas em freezer a -20°C, até o momento do uso.

4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) genérico e eletroforese em gel de poliacrilamida 6%

A reação de amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA foi realizada em 42 amostras, segundo Michalsky *et al.* (2002) e Souza *et al.* (2004), em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer –Gene Amp PCR System 2400) em procedimento “Hot-start”. A mistura de reação foi preparada com 10µl de tampão de PCR (100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 9,0), 5 µl dNTPs (2 mM cada), 2 µl de cada iniciador (200 ng/µl), 0,5 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) (2,5 U/µl) e 26,5 µl de água Milli Q[®].

Foram adicionados 2,0µl de DNA (10 ng/µl) por reação e a amplificação do DNA foi realizada com iniciadores que flanqueiam a região conservada dos minicírculos de kDNA de todas as espécies de *Leishmania* e correspondem à origem de replicação de ambas as fitas de DNA (Degrave *et al.*, 1994): 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'; 5'CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; 5'GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' que amplificam o fragmento de DNA e 120 pares de bases (pb) da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*.

Os ciclos de amplificação consistiram em um passo de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por dez minutos (De Bruijn e Barker, 1992; Michalsky *et al.*, 2002).

Em cada conjunto de reação de PCR, foram incluídos um controle negativo sem DNA e um controle positivo com kDNA purificado da cepa de referência de *L. (L.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Para a detecção do DNA da *Leishmania* foi utilizado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (1970) e modificada por Jackman (1985) *apud* Pinheiro *et al.* (1999) por apresentar maior sensibilidade.

O gel separador foi preparado numa concentração de 6% (Bis-acrilamida 30%, TBE 5x, água Milli Q®, 10ml; persulfato de amônio 10% 125µl, TEMED 12,5µl). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (TA) 2x (400µl DDW; 200µl TA 6x), TA 6x (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, glicerol PA 30%).

Aliquotas de 5µl do marcador PhiX 174RF e da mistura 5µl TA 2x e 5µl da amostra, foram aplicadas no gel de poliacrilamida (6%).

A eletroforese foi realizada em tampão TBE (0,089M TRIS-HCL, 0,089M ácido bórico, 0,02M EDTA) utilizando o sistema PS 500-1. A migração foi feita com uma voltagem inicial de 50V (15mA/gel) por cinco minutos até a separação dos corantes, passando posteriormente a 100V.

Após a eletroforese em temperatura ambiente, o gel foi fixado (etanol PA 15ml; ácido acético 750µl; água Milli Q® 150ml) por 10 minutos, sob agitação suave, e corado com solução de nitrato de prata (0,2%) para melhor visualização das bandas (Blum *et al.*, 1987) e, posteriormente revelado com solução reveladora (NaOH 0,75M 30g; água Milli Q® 1000ml, formaldeído 0,1M 1:100) (Pinheiro *et al.* 1999 modificado).

4.11 Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida 10%

As três amostras positivas no PCR genérico foram submetidas à reação de PCR-RFLP. Os marcadores RFLP são os sítios de restrição e as endonucleases são enzimas que reconhecem e cortam seqüências específicas de DNA. Os fragmentos de DNA foram então, separados segundo seu comprimento por eletroforese em gel de poliacrilamida. A região conservada do minicírculo do kDNA foi utilizada para diferenciar *L. (L.) amazonensis* de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) infantum chagasi* (Volpini *et al.*, 2004).

A endonuclease ApaLI apenas digere o produto de PCR de *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, um de 88 pb e outro de 32 pb, mantendo os fragmentos de 120 pb em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (Andrade *et al.*, 2006). A HaeIII digere o fragmento produto de PCR de 120 pb de *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, um de 80 pb e outro de 40 pb; mas não digere o produto amplificado de *L. (L.) amazonensis* (Volpini *et al.*, 2004). A digestão do produto amplificado de *L. (L.) infantum chagasi* produz bandas com 120, 80, 60 e 40 pbs usando-se a mesma enzima (Andrade *et al.*, 2006).

As amostras referência de *Leishmania* utilizadas foram *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930) e *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75).

Três microlitros do produto amplificado por PCR foram utilizados com a adição de 1,0µl de tampão e 5,9µl de água Milli Q® e as endonucleases 0,1µl de HaeIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou ApaLI (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) para digestão por 3:30 horas à 37°C. Ao produto digerido adicionou-se 10µl de tampão da amostra (TA) 2x

(400µl DDW; 200µl TA 6x), TA 6x (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, glicerol PA 30%).

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida, descrita anteriormente, na concentração de 10%.

Foram aplicados no gel 4,0µl do Padrão de Peso Molecular (PM) e 8,0µl da amostra em cada canaleta. Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2%.

4.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de gene constitutivo específico de flebotomíneo (cacofonia) e eletroforese em gel de poliacrilamida 10%

Para a confirmação de extração de DNA de flebotomíneos, foi utilizado um par de iniciadores para amplificar o gene constitutivo específico (cacofonia) da região IV56 de flebotomíneos neotropicais do gênero *Lutzomyia*: 5Llcaac 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 3Llcaac 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (Lins *et al.*, 2002), gerando um produto de 220 pb, demonstrando que o gene da cacofonia pode ser utilizado como um importante controle interno da reação de PCR, evitando resultados falso negativos.

As reações foram realizadas em um volume final de 27µl contendo Tampão 1X de Taq Polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4,5mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP (invitrogen), 0,2µl de cada iniciador, 1,25U Taq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystem), 2µl de amostra de DNA e 21µl de água Milli Q®.

A mistura foi incubada no termociclador automático (Perkin-Elmer-Gene Amp PCR System 2400) em procedimento “Hot-start” a 94°C por 12 minutos para a ativação da enzima, seguida por 35 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C após o último ciclo, a extensão foi continuada por mais 10 minutos a 72°C.

Foram utilizados 5µl do marcador PhiX147RF para aplicação em gel de poliacrilamida 10% e 10 µl da mistura de TA 2x e 5µl da amostra (1:1).

Para a detecção do DNA de flebotomíneo foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, descrita anteriormente, na concentração de 10%. Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2%.

4.13 Controle de contaminação por DNA exógeno

A contaminação por DNA exógeno foi evitada pelo cuidadoso manuseio de pipetas e reagentes. Um controle negativo sem DNA foi incluído em todos os testes. As amostras positivas foram confirmadas pela repetição da reação.

4.14 Cálculo da taxa mínima de infecção

Devido às amostras serem constituídas por “pools” de insetos (1 “pool” = 10 fêmeas), para o cálculo da taxa mínima de infecção de *L. longipalpis*, adotou-se a fórmula: “Taxa de infecção (TI) = número de grupos (“pools”) positivos x 100 / número total de insetos”, considerando-se no mínimo uma fêmea infectada por amostra.

4.15 Análise estatística dos dados

A análise de regressão múltipla é uma metodologia estatística que utiliza a relação entre duas ou mais variáveis quantitativas ou qualitativas, de tal forma que uma variável pode ser predita a partir de outra. A regressão linear simples apresenta duas variáveis e a relação entre elas pode ser representada por uma linha reta. A análise de regressão apresenta os dados através de um modelo linear aditivo, onde o modelo inclui um componente sistemático (X =variável ambiental) e um aleatório (Y =densidade de flebotomíneos). O indicador utilizado foi o coeficiente de determinação (R^2) entre o par ordenado (X, Y), onde o mesmo demonstra a correlação explicada que minimiza os desvios entre os dados reais e estimados, ou seja, define a qualidade do ajustamento da linha correspondente e determina a qualidade dos dados e das variáveis testadas no modelo de regressão. Portanto, R^2 deve estar entre 0 e 1, matematicamente $0 \leq R^2 \leq 1$. Quanto mais próximo de 1, significa que existe relação explicada entre X e Y .

Para a investigação da associação entre a população de flebotomíneos e o número de casos de LV canina foi utilizado o teste de correlação linear de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Sigma Stat (Jandel, 1995), considerando-se o nível de significância $P \leq 0,05$.

4.16 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso, conforme protocolo nº176/2006-CEP/SES/MT (Anexo 1).

5. RESULTADOS

5.1 Fauna de flebotomíneos

Foram capturados flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* França, 1924 com 22 espécies e uma espécie do gênero *Brumptomyia* França & Parrot, 1921, são elas: *Lutzomyia acantopharynx* Martins, Falcão & Silva, 1962; *L. aragaoi* (Costa Lima, 1932); *L. carmelinoi* Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986; *L. cerradincola* Galati, Nunes, Oshiro & Dorval, 1995; *L. corumbaensis* Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989; *L. dendrophyla* (Mangabeira, 1942); *L. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936); *L. flaviscutellata* (Mangabeira, 1942); *L. hermanlenti* Martins, Silva & Falcão, 1970; *L. lenti* (Mangabeira, 1938); *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912); *L. longipennis* (Barreto, 1946); *L. lutziana* (Costa Lima, 1932); *L. punctigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1944); *L. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939); *L. saulensis* (Floch & Abonnenc, 1944); *L. scaffi* (Damasceno & Arouck, 1956); *L. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927); *L. teratodes* Martins, Falcão & Silva, 1964; *L. termitophila* Martins, Falcão & Silva, 1964; *L. walkeri* (Newstead, 1914); *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *B. brumpti* (Larrousse, 1920).

Do total de 12.833 flebotomíneos, foram capturados 8.484 machos (66,11%) e 4.349 fêmeas (33,89%), sendo que 1.840 dos indivíduos (14,34%) foram coletados no intradomicílio e 10.993 (85,66%) no peridomicílio, conforme Tabela I, que apresenta também o percentual de cada espécie.

A espécie *L. longipalpis* apresentou-se predominante com 65,23% dos indivíduos capturados (Figura 7). A frequência relativa das espécies mais numerosas foi: *L. longipalpis* (65,23%), *L. evandroi* (16,26%), *L. lenti* (7,69%), *L. whitmani* (4,92%), *L. sallesi* (2,34%), *L. termitophila* (1,32%) e outras espécies representaram 2,24%, conforme Figura 8, apresentando preferência pelo ambiente peridomiciliar (Figura 9).

Lutzomyia longipalpis foi freqüente tanto em ambiente intradomiciliar quanto no peridomiciliar (Figuras 10 e 11). Houve predominância de machos em ambos os ambientes (Figura 12).

A distribuição das espécies por mês e por sexo está representada na Tabela II, com ocorrência de *L. evandroi*, *L. longipalpis*, *L. sallesi* e *L. whitmani* em todos os meses trabalhados.

A Tabela III apresenta distribuição mensal em cada um dos bairros pesquisados, onde podemos observar a ocorrência de 3.037 flebotomíneos no bairro Eldorado (23,66%), 6.303 no bairro São Matheus (49,12%) e 3.493 no Parque Sabiá (27,22%). A distribuição dos flebotomíneos apresentou maior abundância no ambiente peridomiciliar do bairro São Matheus, conforme observado na Figura 13.

Conforme Tabela IV, as espécies que ocorreram nos três bairros durante o período da pesquisa foram *L. cerradincola*, *L. evandroi*, *L. hermanlenti*, *L. lenti*, *L. longipalpis*, *L. lutziana*, *L. sallesi*, *L. saulensis*, *L. sordellii*, *L. teratodes*, *L. termitophila*, *L. whitmani* e *B. brumpti*.

Tabela I . Flebotomíneos capturados, por sexo e por ambiente, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Espécie	Intradomicílio		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
1 <i>L. acantopharynx</i>	4	4	2	3	13	0,10
2 <i>L. aragaoi</i>	-	1	-	-	1	0,01
3 <i>L. carmelinoi</i>	2	-	1	1	4	0,03
4 <i>L. cerradincola</i>	1	2	4	1	8	0,06
5 <i>L. corumbaensis</i>	1	-	-	-	1	0,01
6 <i>L. dendrophyla</i>	-	1	-	2	3	0,02
7 <i>L. evandroi</i>	150	162	952	823	2087	16,26
8 <i>L. flaviscutellata</i>	-	3	2	5	10	0,08
9 <i>L. hermanlenti</i>	1	-	1	3	5	0,04
10 <i>L. lenti</i>	39	36	621	291	987	7,69
11 <i>L. longipalpis</i>	853	264	5142	2112	8371	65,23
12 <i>L. longipennis</i>	-	-	-	2	2	0,02
13 <i>L. lutziana</i>	1	-	1	2	4	0,03
14 <i>L. punctigeniculata</i>	-	4	4	7	15	0,12
15 <i>L. sallesi</i>	46	77	78	99	300	2,34
16 <i>L. saulensis</i>	-	-	1	6	7	0,05
17 <i>L. scaffi</i>	-	-	-	1	1	0,01
18 <i>L. sordellii</i>	21	21	13	34	89	0,69
19 <i>L. teratodes</i>	3	10	7	13	33	0,26
20 <i>L. termitophila</i>	18	30	32	89	169	1,32
21 <i>L. walkeri</i>	-	-	5	2	7	0,05
22 <i>L. whitmani</i>	47	22	385	178	632	4,92
23 <i>Lutzomyia</i> spp.	-	1	3	2	6	0,05
24 <i>B. brumpti</i>	6	6	24	23	59	0,46
25 <i>Brumptomyia</i> sp.	-	3	13	3	19	0,15
Sub-Total	1193 (9,30%)	647 (5,04%)	7291 (56,81%)	3702 (28,85%)	12833	100
Total	1840 (14,34%)		10993 (85,66%)		12833	100

L. = *Lutzomyia*; *B.* = *Brumptomyia*

Tabela II. Flebotomíneos capturados com armadilha de CDC por espécie, sexo e mês, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 (*L.* = *Lutzomyia*; *B.* = *Brumptomyia*).

		Espécies de Flebotomíneos																									
Ano	Mês	<i>L. acanthopharynx</i>		<i>L. aragaoi</i>		<i>L. carmelina</i>		<i>L. cerradimicola</i>		<i>L. corumbaensis</i>		<i>L. dendrophyla</i>		<i>L. evandroi</i>		<i>L. flaviscutellata</i>		<i>L. hermanni</i>		<i>L. lenti</i>		<i>L. longipalpis</i>		<i>L. longipennis</i>		<i>L. lutziana</i>	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
2004	Jan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58	61	-	-	-	-	63	46	324	182	-	-	-	-
	Fev	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	228	167	-	-	-	-	174	70	239	136	-	-	-	-
	Mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	306	247	-	1	-	-	184	70	439	143	-	1	-	-
	Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	14	-	-	-	-	8	10	202	155	-	1	-	-
	Mai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	6	-	-	-	-	1	-	28	14	-	-	-	-
	Jun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	7	-	-	-	-	2	-	56	19	-	-	-	-
	Jul	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	12	8	-	2	-	-	4	-	84	24	-	-	-	-
	Ago	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	13	8	1	-	1	-	4	3	310	83	-	-	-	-
	Set	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	16	-	1	-	-	2	1	121	32	-	-	-	-
	Out	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	12	-	-	-	-	12	2	88	26	-	-	-	-
	Nov	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	17	-	-	-	-	9	9	160	46	-	-	-	-
	Dez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	32	-	-	-	-	7	7	395	134	-	-	-	-
2005	Jan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	31	-	-	-	-	7	12	138	41	-	-	-	-
	Fev	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	9	10	-	-	-	-	-	-	30	10	-	-	-	-
	Mar	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	9	12	-	1	-	-	2	4	4	1	-	-	-	-
	Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	19	-	2	-	-	3	4	176	105	-	-	-	-
	Mai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5	-	-	1	-	-	-	167	68	-	-	1	2
	Jun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	9	1	-	-	-	3	3	165	74	-	-	-	-
	Jul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	5	-	-	-	-	2	3	60	11	-	-	-	-
	Ago	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	5	7	-	-	-	1	2	-	100	35	-	-	-	-
	Set	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	2	-	-	-	-	-	2	37	7	-	-	-	-
	Out	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	45	-	-	-	-	9	10	305	95	-	-	-	-
	Nov	3	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	92	75	-	-	-	-	22	18	181	53	-	-	-	-
	Dez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	72	-	-	-	1	57	15	187	27	-	-	-	-
2006	Jan	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	9	6	-	-	-	-	3	2	669	227	-	-	-	-
	Fev	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	91	61	-	-	-	-	79	32	642	260	-	-	-	-
	Mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	21	-	-	-	-	1	2	490	279	-	-	-	-
	Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	5	-	1	-	-	2	104	36	-	-	-	-	
	Mai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	14	22	-	-	1	-	
	Jun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-	80	31	-	-	-	-
	Total	6	7	0	1	3	1	5	3	1	0	0	3	1102	985	2	8	2	3	660	327	5995	2376	0	2	2	2
	%	0,05	0,06	0,00	0,01	0,02	0,01	0,04	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	8,59	7,68	0,02	0,06	0,02	0,02	5,14	2,55	46,72	18,51	0,00	0,02	0,02	0,02

Espécies de Flebotomíneos

Ano	Mês	<i>L. pinetigniculata</i>		<i>L. sallesi</i>		<i>L. santensis</i>		<i>L. scaffi</i>		<i>L. sordehii</i>		<i>L. teratodes</i>		<i>L. termiophila</i>		<i>L. walkeri</i>		<i>L. whimani</i>		<i>Lutzomyia spp.</i>		<i>B. brumpti</i>		<i>Brumptomyia sp.</i>		Total	%
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
2004	Jan	1	1	4	7	-	-	-	-	-	2	1	1	-	7	-	-	4	2	-	-	-	-	2	-	766	5,97
	Fev	1	2	1	8	-	-	-	-	2	3	-	-	1	16	-	-	55	17	-	1	-	-	-	-	1122	8,74
	Mar	-	-	6	9	-	-	-	-	1	1	-	-	6	5	-	-	24	13	-	-	-	-	2	-	1458	11,36
	Abr	-	1	9	6	-	-	-	-	2	1	-	4	-	2	-	-	12	4	-	-	-	-	6	6	455	3,55
	Mai	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	8	2	-	-	-	-	-	-	71	0,55
	Jun	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	12	3	-	-	-	-	-	-	116	0,91
	Jul	-	-	1	3	-	-	-	-	1	1	-	-	4	5	-	-	17	5	-	-	-	-	1	-	174	1,36
	Ago	-	-	6	2	-	-	-	-	2	-	-	1	2	2	-	-	21	15	-	-	-	-	1	-	478	3,73
	Set	-	-	3	1	-	-	-	-	1	2	-	-	3	-	-	-	11	12	-	-	-	-	1	-	217	1,70
	Out	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	160	1,25
	Nov	-	-	4	4	-	-	-	-	1	2	2	1	2	1	-	-	13	6	-	-	4	-	-	-	293	2,28
	Dez	-	1	3	3	1	2	-	-	4	8	-	3	1	4	-	-	22	24	-	-	2	-	-	-	670	5,22
2005	Jan	-	-	1	7	-	-	-	-	-	1	-	1	1	3	-	-	16	3	-	-	3	-	-	-	293	2,28
	Fev	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	4	2	-	-	2	-	-	-	72	0,56
	Mar	-	1	6	9	-	-	-	-	-	1	2	5	1	2	-	-	1	1	2	-	-	3	-	-	70	0,55
	Abr	-	-	5	7	-	-	-	-	-	2	-	2	1	4	-	-	23	16	-	-	9	4	-	-	393	3,06
	Mai	-	-	5	6	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	15	5	-	-	-	5	-	-	286	2,23
	Jun	-	-	5	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	2	-	-	38	20	-	-	2	4	-	-	340	2,65
	Jul	-	1	4	1	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	2	4	-	-	1	-	-	-	100	0,78
	Ago	-	-	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	10	11	-	1	-	-	-	-	199	1,55
	Set	-	-	2	4	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	6	1	-	-	-	1	-	-	70	0,55
	Out	-	-	9	16	-	-	-	1	-	1	-	-	4	3	-	-	22	5	-	-	-	-	-	-	574	4,47
	Nov	1	-	12	18	-	1	-	-	11	9	3	3	12	26	-	-	12	4	-	-	-	5	-	-	565	4,40
	Dez	-	1	4	12	-	1	-	-	2	10	-	1	4	10	5	2	16	1	-	1	4	4	-	-	502	3,91
2006	Jan	1	-	1	8	-	1	-	-	1	1	-	-	-	2	-	-	4	0	-	-	1	-	-	-	939	7,32
	Fev	-	1	9	15	-	-	-	-	-	4	-	-	2	9	-	-	23	6	-	-	-	2	-	-	1239	9,66
	Mar	-	2	8	11	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	20	14	-	-	1	-	-	-	868	6,76
	Abr	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	6	2	-	-	-	-	-	-	161	1,26
	Mai	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	46	0,36
	Jun	-	-	3	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	9	1	1	-	1	1	-	-	136	1,06
	Total	4	11	124	176	1	6	0	1	34	55	10	23	50	119	5	2	432	200	3	3	30	29	13	6	12833	100
	%	0,03	0,09	1,00	1,37	0,01	0,05	0,00	0,01	0,27	0,43	0,08	0,18	0,39	0,93	0,04	0,02	3,37	1,56	0,02	0,02	0,23	0,23	0,10	0,05	100	

Tabela III. Distribuição dos flebotomíneos coletados por bairro, sexo, ambiente e mês, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Ano	Mês	Bairros												Total
		Eldorado				São Matheus				Parque Sabiá				
		intra		peri		intra		peri		intra		peri		
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀			
2004	Jan	3	2	20	17	3	5	131	157	-	-	300	128	766
	Fev	2	2	484	291	2	1	106	73	-	-	107	54	1122
	Mar	5	1	551	355	9	3	103	41	17	4	283	86	1458
	Abr	1	4	37	23	2	6	145	132	7	15	59	24	455
	Mai	3	-	6	8	1	1	11	2	1	-	24	14	71
	Jun	-	-	-	-	-	-	82	34	-	-	-	-	116
	Jul	2	3	16	14	8	4	16	8	55	16	28	4	174
	Ago	12	8	52	24	43	9	125	41	75	25	55	9	478
	Set	2	4	18	14	11	4	59	25	30	7	32	11	217
	Out	25	11	25	17	5	-	21	7	8	4	32	5	160
	Nov	27	11	31	18	10	2	49	17	7	4	83	34	293
	Dez	32	12	190	80	3	3	31	24	9	6	187	93	670
2005	Jan	31	6	33	39	4	2	13	7	33	18	80	27	293
	Fev	14	4	8	4	-	1	18	13	4	1	4	1	72
	Mar	3	4	11	11	-	-	10	8	2	6	3	12	70
	Abr	4	9	13	16	3	7	200	120	3	6	5	7	393
	Mai	1	2	4	7	6	2	179	77	2	1	1	4	286
	Jun	4	1	18	12	17	5	180	88	3	1	4	7	340
	Jul	1	1	2	4	5	3	33	13	2	1	29	6	100
	Ago	1	3	9	12	17	12	39	21	13	3	49	20	199
	Set	2	1	8	5	9	4	10	5	8	2	15	1	70
	Out	4	6	17	24	65	38	266	91	9	8	36	10	574
	Nov	15	14	8	12	112	94	186	78	7	6	21	12	565
	Dez	8	4	14	27	103	33	180	71	9	13	30	10	502
2006	Jan	4	4	15	7	41	16	620	211	2	2	9	8	939
	Fev	4	5	24	21	106	53	465	196	9	5	240	111	1239
	Mar	-	1	6	6	53	38	199	107	4	7	274	173	868
	Abr	2	1	1	2	-	5	19	4	2	-	89	36	161
	Mai	1	2	-	1	2	-	17	19	-	1	1	2	46
	Jun	2	2	1	1	16	5	63	25	1	1	13	6	136
	Sub-Total	215	128	1622	1072	656	356	3576	1715	322	163	2093	915	12833
	Sub-Total	343 (2,67%)	2694 (20,99%)	1012 (7,89%)	5291 (41,23%)	485 (3,78%)	3008 (23,44%)	12833						
	Total	3037 (23,66%)				6303 (49,12%)				3493 (27,22%)				12833

Tabela IV. Flebotomíneos coletados por bairro, ambiente e sexo no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Espécie	Eldorado				São Matheus				Parque Sabiá				Total
	intra		peri		intra		peri		intra		peri		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>L. acantopharynx</i>	-	-	-	-	4	2	-	1	-	2	2	2	13
<i>L. aragaoi</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>L. carmelinoi</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	1	4
<i>L. cerradincola</i>	-	-	2	-	-	2	2	1	1	-	-	-	8
<i>L. corumbaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>L. dendrophyla</i>	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	3
<i>L. evandroi</i>	30	29	653	538	90	84	174	144	30	49	125	141	2087
<i>L. flaviscutellata</i>	-	2	2	4	-	1	-	1	-	-	-	-	10
<i>L. hermanlenti</i>	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	1	5
<i>L. lenti</i>	18	8	371	171	11	20	109	50	10	8	141	70	987
<i>L. longipalpis</i>	136	52	436	184	482	139	3012	1325	235	73	1694	603	8371
<i>L. longipennis</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>L. lutziana</i>	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	4
<i>L. punctigeniculata</i>	-	1	3	4	-	3	1	3	-	-	-	-	15
<i>L. sallesi</i>	12	22	42	43	24	44	28	46	10	11	8	10	300
<i>L. saulensis</i>	-	-	1	2	-	-	-	2	-	-	-	2	7
<i>L. scaffi</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>L. sordellii</i>	2	2	6	15	14	17	2	10	5	2	5	9	89
<i>L. teratodes</i>	-	2	4	5	2	5	2	4	1	3	1	4	33
<i>L. termitophila</i>	2	4	19	39	14	23	10	34	2	3	3	16	169
<i>L. walkeri</i>	-	-	-	1	-	-	5	1	-	-	-	-	7
<i>L. whitmani</i>	12	4	61	46	10	8	216	83	25	10	108	49	632
<i>Lutzomyia</i> spp.	-	-	2	-	-	1	1	-	-	-	-	2	6
<i>B. brumpti</i>	3	1	10	13	2	4	10	7	1	1	4	3	59
<i>Brumptomyia</i> spp.	-	1	8	2	-	1	4	-	-	1	1	1	19
Sub-Total	215	128	1622	1072	656	356	3576	1715	322	163	2093	915	12833
Sub-Total	343		2694		1012		5291		485		3008		12833
Total	3037				6303				3493				12833

L. = *Lutzomyia*; *B.* = *Brumptomyia*

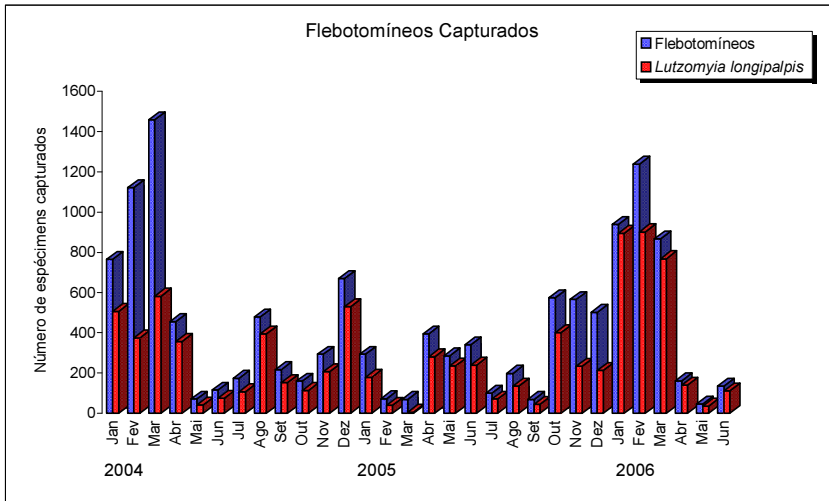


Figura 7. Distribuição mensal de flebotomíneos capturados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

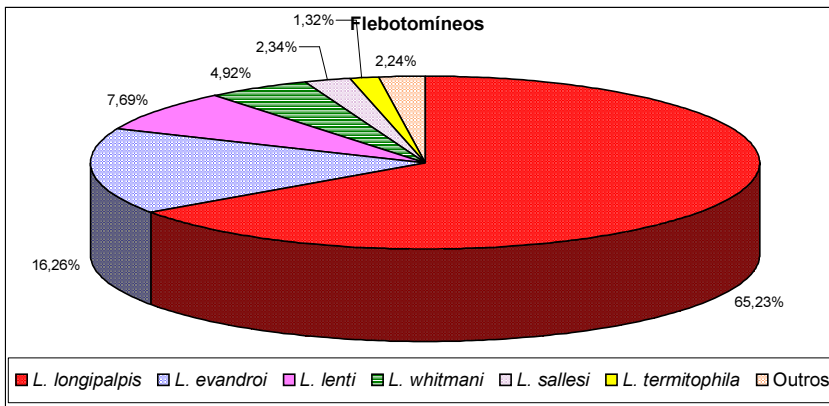


Figura 8. Flebotomíneos capturados no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

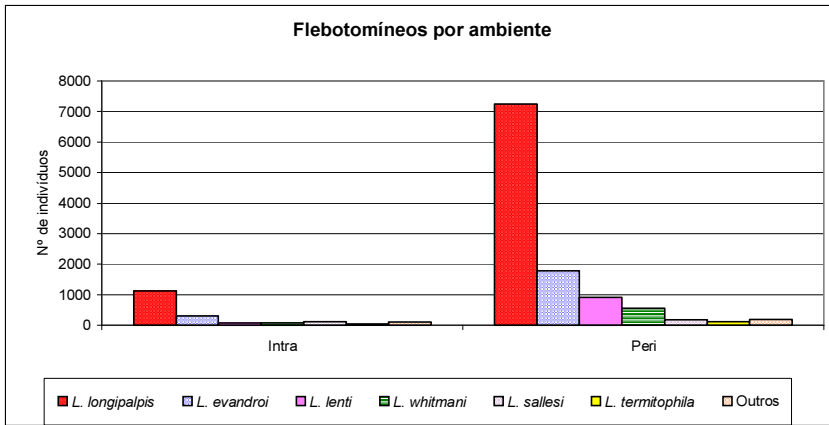


Figura 9. Flebotomíneos capturados nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

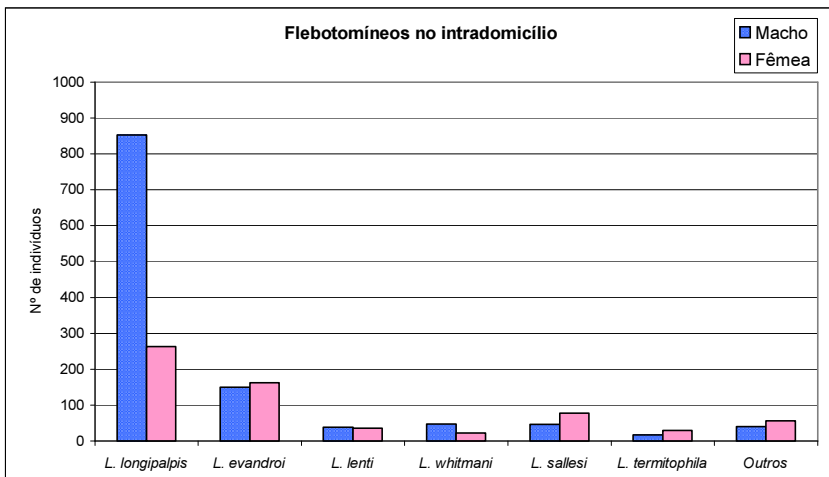


Figura 10. Flebotomíneos capturados no ambiente intradomiciliar, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

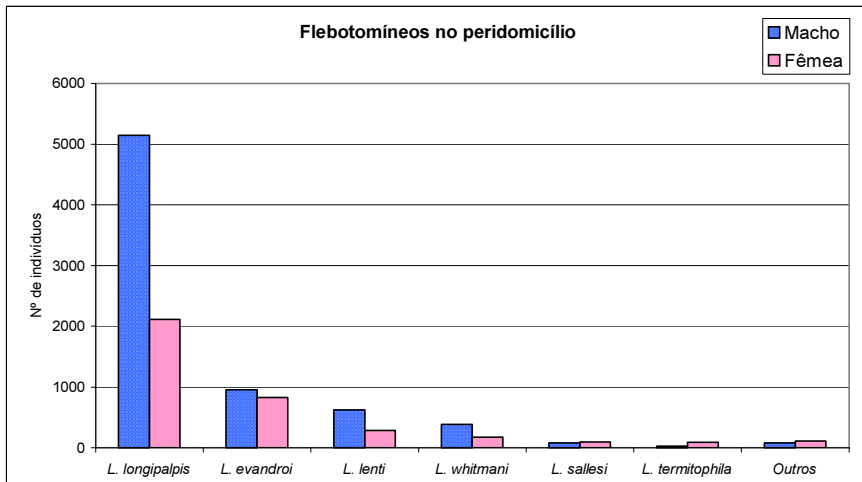


Figura 11. Flebotomíneos capturados no ambiente peridomiciliar, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

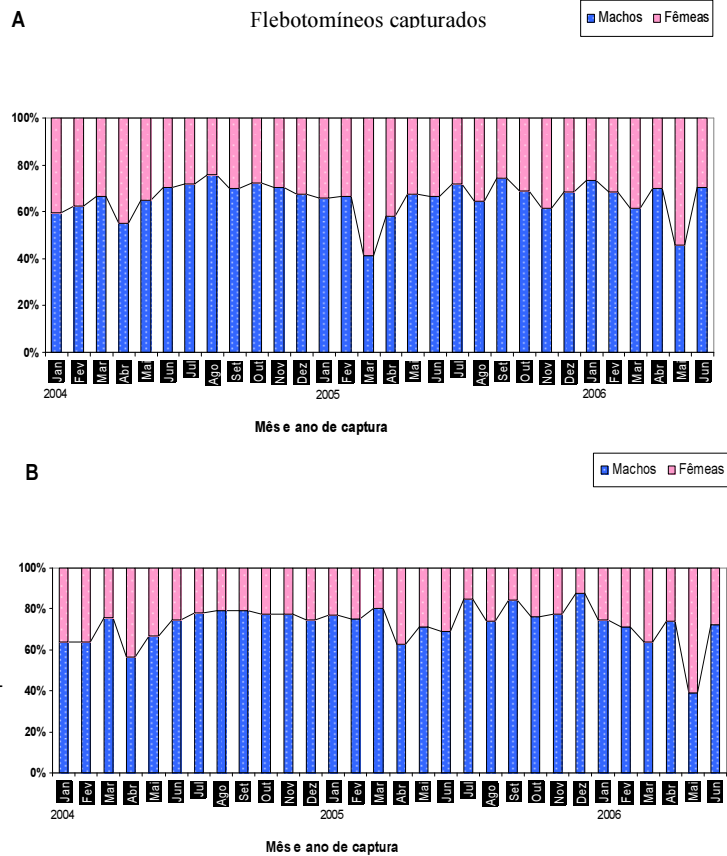


Figura 12. Distribuição percentual de flebotomíneos capturados de acordo com o sexo, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006. A. Exemplos de flebotomíneos (diversas espécies); B. Exemplos de *L. longipalpis*

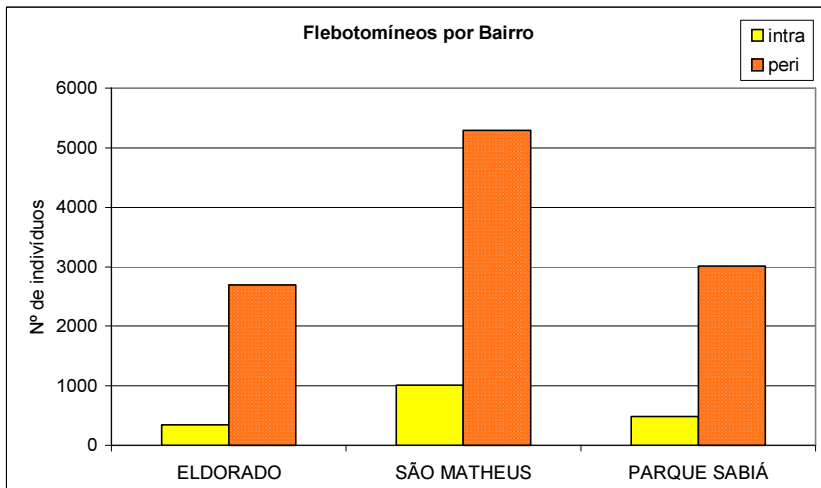


Figura 13. Flebotomíneos capturados nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

5.2 Dados bioclimáticos

Na Tabela V e na Figura 14 estão os dados de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm³) média mensal do município de Várzea Grande, do período da pesquisa.

Tabela V. Condições climáticas no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Ano	Mês	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação (mm ³)
2004	Jan	27,20	83,00	174,90
	Fev	27,40	84,00	223,10
	Mar	27,70	79,00	71,20
	Abr	27,00	81,00	93,00
	Mai	23,20	84,00	19,80
	Jun	23,90	71,00	-
	Jul	23,40	72,00	62,70
	Ago	25,20	60,00	-
	Set	27,20	52,00	11,90
	Out	28,20	67,00	103,80
	Nov	27,10	75,00	216,80
	Dez	27,90	72,00	176,90
2005	Jan	27,90	83,00	131,10
	Fev	26,50	96,00	220,90
	Mar	27,50	78,00	200,80
	Abr	23,20	64,00	56,20
	Mai	22,90	66,00	8,10
	Jun	18,10	64,00	14,30
	Jul	23,70	61,00	-
	Ago	26,40	53,00	1,00
	Set	25,80	63,00	43,30
	Out	28,30	69,00	121,40
	Nov	27,90	72,00	90,50
	Dez	27,70	76,00	104,10
2006	Jan	27,20	79,00	152,90
	Fev	27,00	82,00	355,50
	Mar	27,00	84,00	273,10
	Abr	25,90	82,00	154,70
	Mai	22,90	73,00	12,50
	Jun	21,00	67,00	7,20

Fonte: 9º Distrito de Meteorologia/MT/INMET

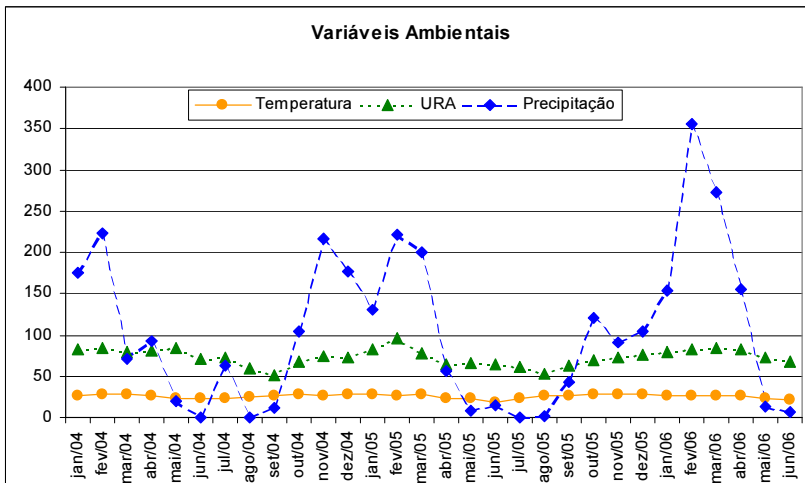


Figura 14. Variáveis bioclimáticas no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 (Fonte: 9º Distrito de Meteorologia/MT/INMET).

5.3 Fauna de flebotomíneos e os dados bioclimáticos

No presente estudo não foram observadas correlações significativas entre as variáveis independentes (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) e a variável dependente (flebotomíneos), encontrando-se valores de R^2 iguais a 0,1672, 0,1044 e 0,2653 respectivamente, com $P \leq 0,05$.

Observou-se um discreto aumento da densidade de flebotomíneos, em especial de *L. longipalpis* no período subsequente as primeiras chuvas e com registro dos maiores valores de umidade relativa do ar (entre os meses de outubro e março) conforme Figura 15, porém a associação não foi estatisticamente significativa (Figura 16).

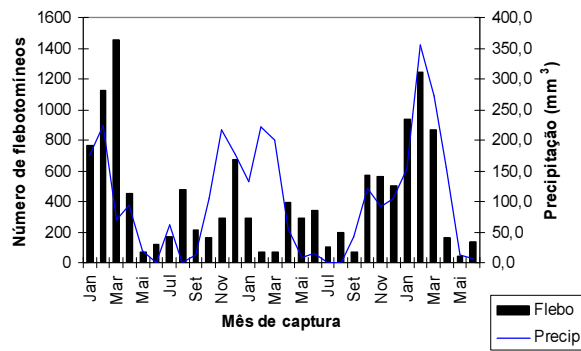
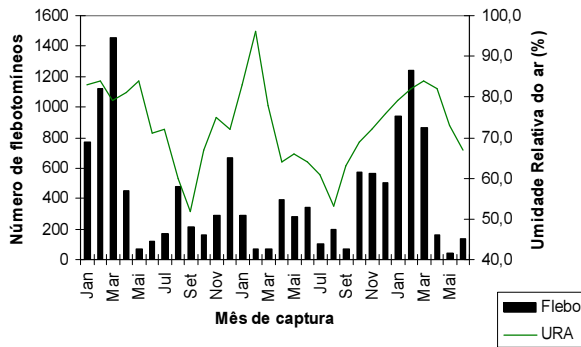
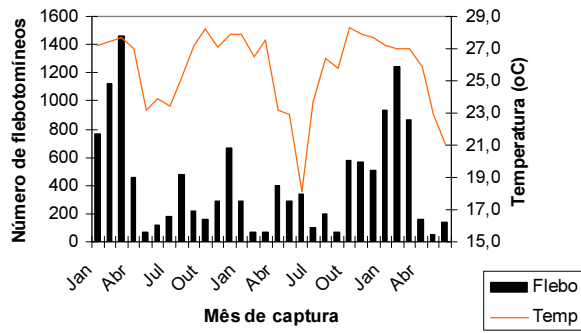


Figura 15. Número de indivíduos de flebotomíneos em relação à média de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm³) no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

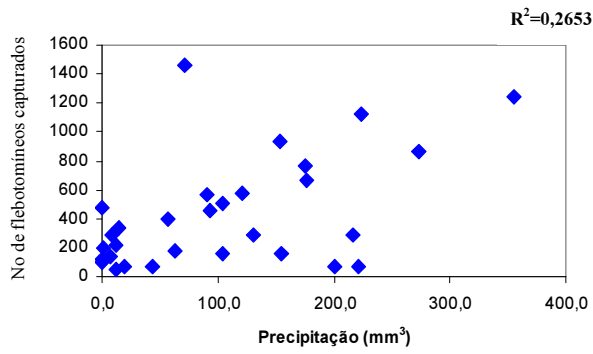
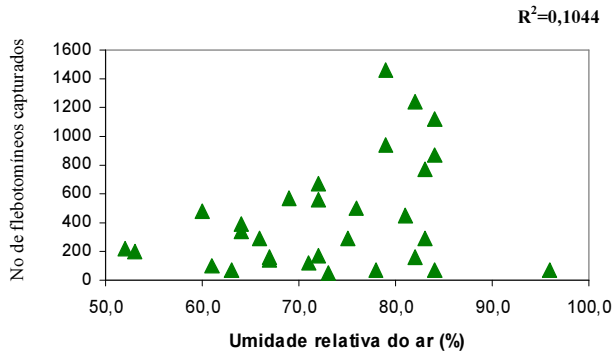
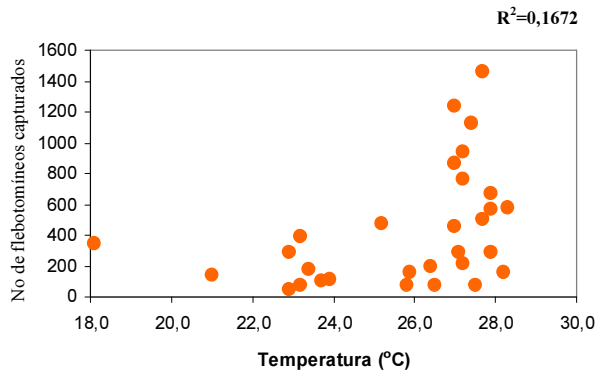


Figura 16. Diagrama de dispersão entre o número de flebotomíneos capturados e as variáveis ambientais temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm³) no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

5.4 Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis*

Do total de 2.376 fêmeas de *L. longipalpis* capturadas no período da pesquisa, 104 foram encontradas ingurgitadas, representando 4,38%. Das 104 fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas, 32 (30,77%) foram capturadas no intradomicílio e 72 (69,23%) no peridomicílio.

Na Tabela VI demonstra-se a reação do conteúdo intestinal ao teste de precipitina, onde podemos observar a alimentação exclusiva em determinado hospedeiro ou mista em diferentes hospedeiros.

A Tabela VII mostra que *L. longipalpis* alimentou-se preferencialmente em aves (30,77%) e roedores (21,15%), mas também foi encontrada alimentada de sangue de humanos, gambás, bois, cavalos e cães (Figura 17).

Tabela VI. Fêmeas de *L. longipalpis* segundo teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.

Anti-soro	Intra	Peri	Número absoluto
Ave	6	19	25
Boi	2	7	9
Cão	-	2	2
Cavalo	4	4	8
Gambá	6	6	12
Humano	5	7	12
Roedor	4	12	16
Ave e Cão	-	2	2
Ave e Humano	-	1	1
Ave e Roedor	1	3	4
Boi e Roedor	1	1	2
Cão e Humano	-	1	1
Não Reagente	3	7	10
Total	32	72	104

Tabela VII. Preferência alimentar de fêmeas de *L. longipalpis* no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.

Anti-soro	Número Absoluto	Porcentagem Relativa (%)
Ave	32	30,77
Roedor	22	21,15
Humano	14	13,46
Gambá	12	11,54
Boi	11	10,58
Não Reagente	10	9,62
Cavalo	8	7,69
Cão	5	4,81

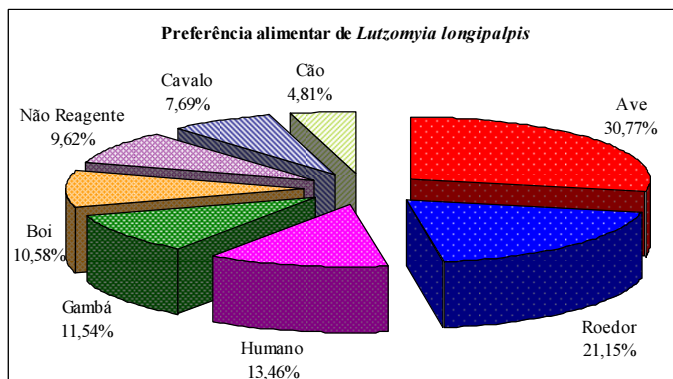


Figura 17. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 1998 a junho de 2006.

5.5 Casos humanos de LV

O número de casos humanos de LV notificados no município de Várzea Grande está representado na Figura 18, que demonstra uma queda acentuada a partir do ano de 1999, fato este observado no Estado como um todo, tendo em vista que os dados de Várzea Grande representaram cerca de 1/3 dos casos totais registrados em Mato Grosso. A distribuição mensal dos casos foi irregular, não sendo caracterizado o padrão sazonal de transmissão.

A relação do número de casos humanos com a densidade de *L. longipalpis* nos bairros pesquisados pode ser observada na Figura 19, onde podemos verificar que período em que não foram observados casos humanos da doença corresponde ao de menores densidades vetoriais.

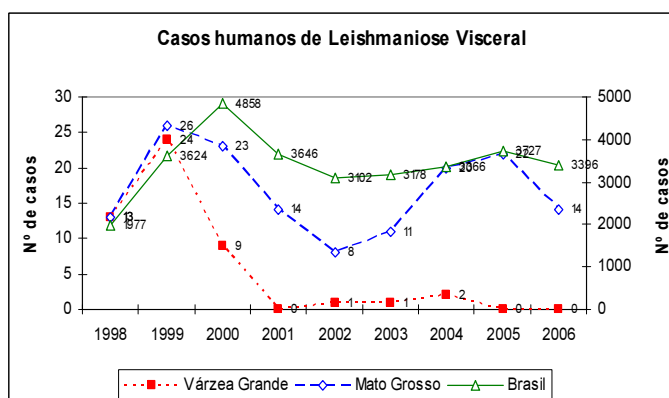


Figura 18. Histórico dos casos humanos de LV no município de Várzea Grande, Mato Grosso e no Brasil, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2006 (Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

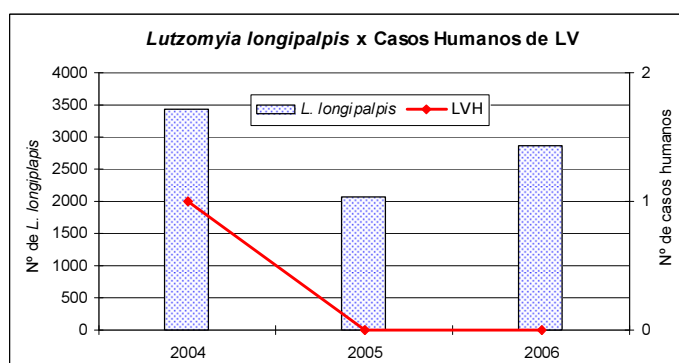


Figura 19. Relação de número de Flebotomíneos e ocorrência de casos humanos de LV nos bairros pesquisados do município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

5.6 Inquérito Canino

Durante o período de janeiro de 2004 a junho de 2006, amostras de sangue de 1886 cães domiciliados na área pesquisada foram coletadas e analisadas para a presença de *Leishmania*. A taxa de frequência de LV canina variou entre 6,79 a 63,34%, dependendo do bairro ou do ano pesquisado (Tabela VIII), ficando em torno de 11,40% a taxa média de soropositividade da área. As taxas acumuladas do período nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá foram de 13,24%, 10,76% e 4,70%, respectivamente.

Tabela VIII. Prevalência canina de inquérito realizado nos bairros Eldorado, São Matheus e Parque Sabiá, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006

Bairro	2004			2005			2006*		
	Nº. Exames	Nº. Positivos	Prevalência (%)	Nº. Exames	Nº. Positivos	Prevalência (%)	Nº. Exames	Nº. Positivos	Prevalência (%)
Eldorado	486	33	6,79	14	4	28,57	3	1	33,33
São Matheus	968	84	8,68	11	7	63,34	-	-	-
Parque Sabiá	398	84	21,11	6	2	33,33	-	-	-
Total	1852	201	10,85	31	13	41,94	3	1	33,33

* Dados até o mês de junho

5.7 Relação entre vetor, prevalência canina e casos humanos de LV

Na área pesquisada, não foi observada relação entre a distribuição de *L. longipalpis*, a ocorrência de casos humanos e a presença de cães sorologicamente positivos (Tabela IX).

Tabela IX. Número de *Lutzomyia longipalpis* coletados, casos humanos de LV e prevalência canina por bairro pesquisado, município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Bairro	2004				2005				2006*			
	<i>L. longipalpis</i>		LVH	PreC	<i>L. longipalpis</i>		LVH	PreC	<i>L. longipalpis</i>		LVH	PreC
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Eldorado	680	19,77	-	6,79	97	4,67	-	28,57	31	1,09	-	33,33
São Matheus	1209	35,15	1	8,68	1625	78,24	-	63,64	2124	74,42	-	0,00
Parque Sabiá	1551	45,09	-	21,11	355	17,09	-	33,33	699	24,49	-	0,00
Total	3440	100	1	10,85	2077	100	-	41,94	2854	100	-	33,33

*Dados até o mês de junho

LVH: Leishmaniose Visceral Humana

PreC: Prevalência canina

5.8 DNA de *Leishmania* spp. em espécimes de *L. longipalpis* naturalmente infectados

Amostras enumeradas de 1 a 42 formadas por “pool” de 10 fêmeas, totalizando 420 indivíduos de *L. longipalpis*, anteriormente dissecadas para a confirmação da espécie, foram utilizadas para a extração de DNA. A amplificação de produtos característicos de *Leishmania* spp. (120 pb) foi observada nas amostras 2, 4 e 7, conforme observado na Figura 20. As demais amostras não apresentaram produto amplificado de *Leishmania* spp.

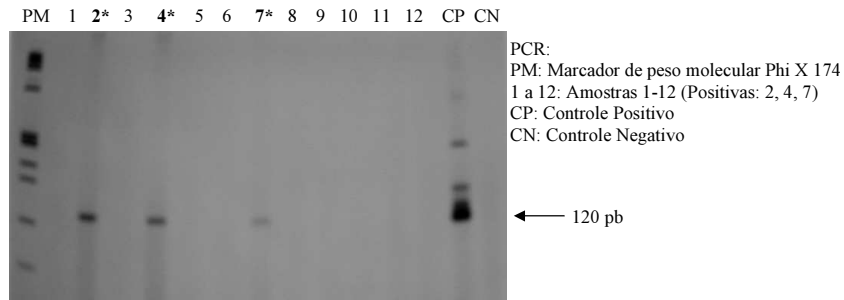


Figura 20. Produto de PCR após amplificação de DNA de amostras de flebotomíneos, utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de *Leishmania* spp. Observar amostras positivas de números 2, 4 e 7 (asteriscos). Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata 0,2%. (Foto: NAM).

O fragmento de 120pb foi observado em três dos 42 “pools” de amostras. Considerando-se no mínimo uma fêmea positiva em cada uma das três amostras, num universo de 420 indivíduos, podemos inferir a taxa mínima de infecção natural em torno de 0,71%. A possibilidade de falsos negativos e/ou contaminação na reação de amplificação foi investigada através da repetição do PCR de todas as amostras. O bairro com maior frequência de positividade foi o São Matheus apresentando “pool” de flebotomíneo positivo nos anos de 2005 e 2006, conforme apresentado pela Tabela X.

Para a confirmação dos resultados, repetiram-se a amplificação e a eletroforese das amostras 2, 4 e 7 (Figura 21), que positivaram no experimento anterior, confirmando a presença de bandas características de *Leishmania* spp (120pb).

Tabela X. Frequência de “pools” de *L. longipalpis* infectados por *L. (L.) infantum chagasi*, por bairro, no município de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006.

Ano	Bairro	Amostras Testadas		Amostras Positivas	
		Nº.	%	Nº.	%
2004	Eldorado	1	2,38	-	-
	São Matheus	1	2,38	-	-
	Parque Sabiá	1	2,38	1	0,24
2005	Eldorado	1	2,38	-	-
	São Matheus	1	2,38	1	0,24
	Parque Sabiá	-	-	-	-
2006	Eldorado	1	2,38	-	-
	São Matheus	19	45,24	1	0,24
	Parque Sabiá	17	40,48	-	-
Total		42 (420 fêmeas)	100	3	0,71

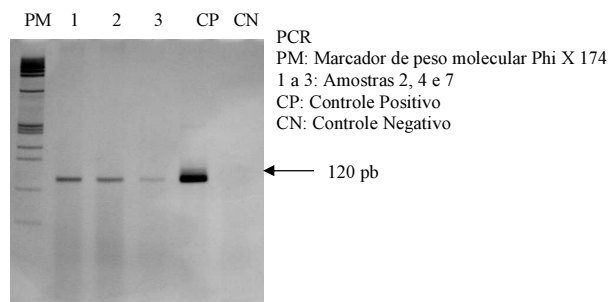


Figura 21. Produto de PCR após amplificação de DNA de amostras positivas de flebotomíneos (2, 4 e 7), utilizando-se iniciadores gêneros-específicos de *Leishmania* spp. Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata 0,2%. (Foto: NAM).

5.9 DNA de *L. (L.) infantum chagasi* em *L. longipalpis* naturalmente infectadas

Foi realizada a PCR-RFLP das amostras 2, 4 e 7 e do DNA de referência de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, digeridos com as enzimas de restrição ApaLI e HaeIII.

Comparando-se os fragmentos de DNA gerados pela digestão de produto amplificado de amostras de flebotomíneos com os fragmentos de DNA de referência, observou-se que as três amostras foram identificadas com padrão de *L. (L.) infantum chagasi*, conforme Figura 22.

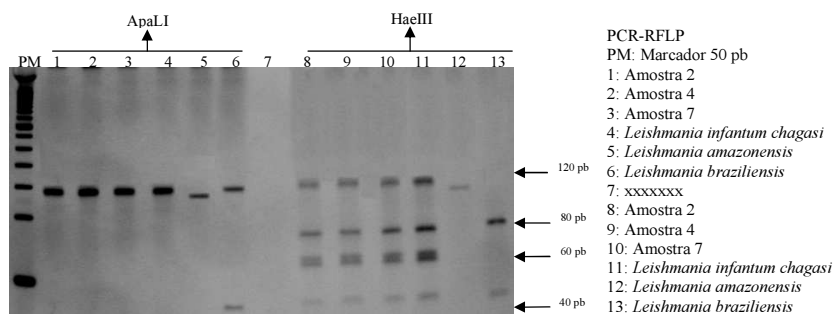


Figura 22. Produto de amplificação por PCR de região conservada de minicírculo kDNA de *Leishmania* após digestão com endonuclease ApaLI e HaeIII e marcador Padrão de PM (Invitrogen). DNA de referência: *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930) e *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75). Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata 0,2%. (Foto: NAM).

5.10 DNA de flebotomíneos (cacofonia)

Todas as amostras analisadas revelaram fragmentos de 220pb correspondendo ao gene amplificado de cacofonia após a eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme observado na Figura 23.

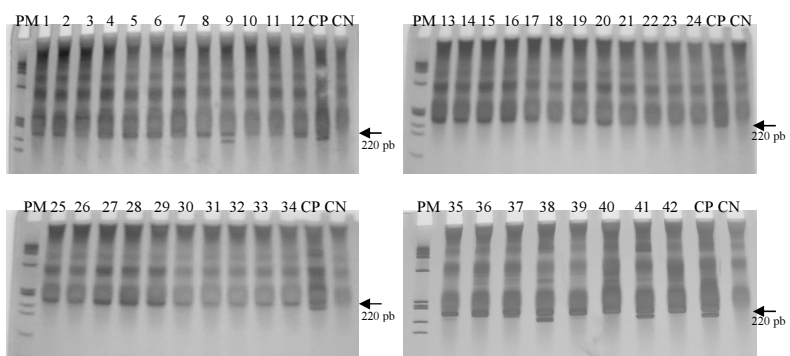


Figura 23. Produto de amplificação por PCR do gene constitutivo do gênero *Lutzomyia* (gene da cacofonia). Iniciadores 5Llac/3Llac. Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata 0,2%. PM: PHi X 174; 1 a 42: Amostras; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo. (Foto: NAM).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho observou-se uma **predominância de *L. longipalpis*** dentre os flebotomíneos capturados. Estes dados estão em conformidade com dados de Missawa e Lima (2005) e Ribeiro *et al.* (2000) para o mesmo município e também com dados de outros locais, conforme Sousa *et al.* (2007a) em Juazeiro do Norte, Barbalha e Missão Velha/CE, Sousa *et al.* (2007b) em Iguatu/CE, Sousa *et al.* (2007c) em Tauá/CE, Santalucia *et al.* (2007) em São Domingos/GO, Resende *et al.* (2006) e Souza *et al.* (2004) em Belo Horizonte/MG, Martin e Rebêlo (2006) em Santa Quitéria/MA, Barata *et al.* (2005), França-Silva *et al.* (2005) e Barata *et al.* (2004) em Porteirinha/MG, Monteiro *et al.* (2005) em Montes Claros/MG, Oliveira *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2006) em Campo Grande/MS, Andrade Filho *et al.* (2001) no estado do Tocantins, Ximenes *et al.* (1999) no Rio Grande do Norte, Rebêlo *et al.* (1999) na ilha de São Luis/MA e Biancardi (1996) em Chapada dos Guimarães/MT. A alta capacidade vetorial associada à antropofilia a ao encontro desse inseto no intra e no peridomicílio, fazem dessa espécie, o flebotomíneo de maior importância médica na transmissão de LV (Soares e Turco, 2003). *L. longipalpis* é o mais abundante na captura com armadilhas luminosas, raramente é capturado em armadilha de Shannon e não é atraído por iscas humanas (Galati *et al.*, 2006).

A **presença no ambiente peridomiciliar** observada em nossos resultados também foi verificada nos trabalhos de Dias *et al.* (2007a), Sampaio *et al.* (2007), Martin e Rebêlo (2006), Resende *et al.* (2006), Barata *et al.* (2005), Monteiro *et al.* (2005), Souza *et al.* (2005), Souza *et al.* (2004), Oliveira *et al.* (2003), Aguiar e Medeiros (2003), Andrade-Filho *et al.* (2001) e Rebêlo *et al.* (1999) em vários estados do Brasil, demonstrando ser o processo de domiciliação desta espécie influenciado por modificações de hábitat gerada pela ação antrópica e pelo poder adaptativo dessa espécie, embora Resende *et al.* (2006) tenham observado semelhante proporção de flebotomíneos, principalmente de *L. longipalpis* nos ambientes intra e peridomiciliar.

L. longipalpis freqüente em ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, é uma espécie que possui capacidade de estabelecer-se em diferentes hábitats (Young e

Duncan, 1994; Barata *et al.*, 2005), podendo inferir que a transmissão da LV possa estar também ocorrendo dentro das residências, e que esta espécie possui tendência à antropofilia (Rebello *et al.*, 1999). A ocorrência de insetos no intradomicílio pode ser justificada pela proximidade das criações e abrigos de animais domésticos com as residências e a capacidade endofilica da espécie.

A distribuição peridoméstica pode ser justificada devido às maiores concentrações serem observadas em abrigos de animais, onde os flebotomíneos podem formar “leks” ou agregados em abundância sobre hospedeiros estacionários como cães e galináceos (Lainson e Rangel, 2003; Ximenes *et al.*, 1999), provavelmente devido aos feromônios produzidos pelo inseto macho que atrai fêmeas para o local de alimentação e também outros machos para a cópula, aumentando o sucesso reprodutivo da espécie. Os primeiros machos parecem ser atraídos pelo odor (caimomônio) produzido pelos hospedeiros vertebrados.

Este fato pode ser explicado pela atração diferenciada para diferentes sexos em coleatas realizadas com armadilhas luminosas, conforme observado por Aguiar *et al.* (1985), ou à exposição das armadilhas próximas aos criadouros, pois segundo Feliciangeli (1987), os machos num comportamento natural, atraem as fêmeas para assegurar a fertilização durante os deslocamentos, formando agregados com o propósito do acasalamento.

A predominância de machos no intra e no peridomicílio corroborou com dados de Dias *et al.* (2007a), Sampaio *et al.* (2007), Rezende *et al.* (2007), Sousa *et al.* (2007a), Sousa *et al.* (2007c), Martin e Rebello (2006), Oliveira *et al.* (2006), Resende *et al.* (2006), Barata *et al.* (2005), Barata *et al.* (2004), Oliveira *et al.* (2003) e Ximenes *et al.* (1999), demonstrando uma grande capacidade de adaptação.

Souza *et al.* (2007a) observaram **uma maior densidade de fêmeas** de flebotomíneos na Serra do Carajás/PA e a maior densidade de machos em relação às fêmeas também não foi observada em condições de laboratório por Luitgards-Moura *et al.* (2000) que verificaram que o número de fêmeas emergidas excederam o número de

machos em todas as gerações, e ainda que os machos emergiam de dois a três dias antes das fêmeas, e quando estas emergiam os machos já estariam prontos para a cópula, considerando-se o tempo necessário para a maturação sexual como a rotação da genitália e a produção de feromônios. Cazemajor *et al.* (1997) e Owusu-Daaku *et al.* (1997) explicam que a predominância de fêmeas em várias gerações, pode ser devido às flutuações dos genes que alteram a proporção sexual. Essas flutuações podem ser oscilações naturais ou o começo da fixação do gene.

A **presença de *L. longipalpis* em todos os meses do ano** foi observada no município de Várzea Grande, assim como trabalhos realizados em Dracena e Promissão/SP (Sampaio *et al.*, 2007), Porteirinha/MG (França-Silva *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2004), Montes Claros/MG (Monteiro *et al.*, 2005), Belo Horizonte/MG (Souza *et al.*, 2004) e Campo Grande (Oliveira *et al.*, 2003). Reconhece-se que o estudo da sazonalidade só apresenta dados confiáveis e consistentes quando se tem uma investigação de, no mínimo, dois anos consecutivos, para comparação dos resultados, diminuindo-se a margem de erros proporcionados por anos atípicos (Dias *et al.*, 2007a).

A **urbanização dos insetos** e, conseqüentemente da doença estão relacionadas ao crescimento desordenado das cidades, seguidas de migração e êxodo rural e à destruição do meio ambiente, associado ao aumento da crise social e transformações ambientais como secas prolongadas e periódicas que propiciam condições adequadas para a ocorrência de novos focos da LV em área urbana (Vieira e Coelho, 1998; Brasil, 2002).

A presença de algumas espécies vetoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), como *L. whitmani* em grandes densidades e *L. flaviscutellata* em baixo número, chama a atenção para a importância da vigilância da doença na área de pesquisa.

A **correlação significativa da densidade de insetos e as variáveis bioclimáticas** pesquisadas, também não foram observadas em estudos de Dias *et al.* (2007a) em Varzelândia/MG, Martin e Rebêlo (2006) em Santa Quitéria/MA, Souza *et al.* (2004) em Belo Horizonte/MG e de Rebêlo (2001) na Ilha de São Luís/MA. O efeito

não significativo da temperatura na densidade de flebotomíneos foi observado em Porteirinha/MG por Barata *et al.* (2004), embora Monteiro *et al.* (2005) tenham correlacionado as altas temperaturas com o pico de transmissão da doença em Montes Claros.

França-Silva *et al.* (2005), não observaram correlação entre a densidade dos vetores e as variáveis umidade relativa do ar e temperatura em Porteirinha/MG. Resende *et al.* (2006) relataram aumento do número de flebotomíneos, principalmente de *L. longipalpis* quando ocorreu a combinação de altas médias de temperatura e ocorrência de chuvas regulares em Belo Horizonte/MG.

A associação entre a densidade de flebotomíneos com a ocorrência das primeiras chuvas e registro dos maiores valores de umidade relativa do ar foi observada por Resende *et al.* (2006), Monteiro *et al.* (2005), Barata *et al.* (2004) e Oliveira *et al.* (2003), justificada pelo período apresentar ambiente favorável para a emergência de formas aladas naqueles locais (Forattini, 1953), sem que períodos mais secos chegassem a eliminar o vetor, pois estes resistiriam à higrometria mínima (Costa, 2005), comprovado por estudo de Martin e Rebêlo (2006) que encontraram predomínio flebotomíneos no período de estiagem em Santa Quitéria/MA.

Além das variáveis bioclimáticas analisadas, outros aspectos ambientais do peridomicílio devem ser analisados como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo que representam possíveis abrigos e criadouros para o vetor (Camargo-Neves *et al.*, 2001).

Segundo Barata *et al.* (2005), a busca por fontes de alimentação é uma resposta comportamental que afeta a reprodução e a densidade populacional das espécies de flebotomíneos. Assim, dependendo do seu grau de adaptação às condições ambientais modificadas pelo homem, algumas espécies podem ser mais facilmente encontradas em ambientes peridomiciliares que outras.

Em Várzea Grande, observou-se a **preferência alimentar de *L. longipalpis*** por aves e/ou galinhas, essa atração foi também observada por Aguiar *et al.* (1987) no estado do Rio de Janeiro e por Barata *et al.* (2005) em Porteirinha/MG. Marassá *et al.* (2006) observaram que 72% de *L. longipalpis* capturados na Serra da Bodoquena/MS foram reagentes para aves mediante técnica imunoenzimática do ELISA de captura. Casanova *et al.* (2007b) identificaram criadouros naturais de *L. longipalpis* em uma área urbana endêmica para LV no estado de São Paulo e observaram que os galinheiros representaram o ecótopo mais produtivo e com padrão de distribuição espacial agregado. Moreno *et al.* (2005) não observaram associação entre a infecção de *L. (L.) infantum chagasi* e a presença de galinhas ou galinheiros no estado de Minas Gerais.

O considerável número de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue humano seja exclusivamente ou combinado com sangue de outros animais como ave e cão (Missawa e Dias, 2007), evidencia o caráter antropofílico da espécie. O caráter oportunista de poder sugar em uma ampla variedade de vertebrados foi relatado por Barata *et al.* (2005) que observaram a preferência de fêmeas de *L. longipalpis* por galinhas e cavalos, mas também se alimentaram de sangue de roedores, cães, bois e homem. O caráter eclético foi observado também por Passos-Dias *et al.* (2003) no município de Raposa/MA. Segundo Camargo-Neves *et al.* (2007a), no município de Araçatuba/SP, *L. longipalpis* mostrou hábito eclético, demonstrando alto grau de cinofilia (preferência por sangue canino).

Ximenes *et al.* (1999) realizaram pesquisa de preferência alimentar com oferta de diferentes animais para o repasto sanguíneo e observaram que 95% de todos os flebotomíneos capturados em cavalos eram *L. longipalpis*, atraindo muito mais insetos que os outros animais ofertados.

Zeledon *et al.* (1984) destacaram a atração de *L. longipalpis* por cães, o que não foi observada nesta pesquisa e nos trabalhos de Morrison *et al.* (1993). Apesar da baixa porcentagem de fêmeas que se alimentaram em cães (5/104), a presença de gambás no peridomicílio, atuando como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre aumenta o risco da infecção canina em 2,6 vezes (Cabrera *et al.*, 2003).

Em estudos realizados com *L. intermedia*, Afonso *et al.* (2005) observaram a preferência por roedores e aves, tanto em flebotomíneos capturados no intra quanto no peridomicílio em Mesquita/RJ, embora Rangel *et al.* (1990) tenham observado flebotomíneos se alimentando principalmente de cães no peridomicílio do mesmo município. Nery *et al.* (2004) indicaram a predominância de sangue de roedores e cães em *L. umbratilis* e *L. spathotrichia* capturados em Manaus/AM.

A fonte alimentar dos vetores propicia informação sobre a preferência por hospedeiros em circunstâncias naturais. A intensidade da antropofilia é um dos fatores essenciais na avaliação da capacidade vetorial, enquanto a atração por outros hospedeiros pode dar respostas sobre a associação entre vetores potenciais e reservatórios naturais (Afonso *et al.*, 2005).

O número de **casos humanos de LV** observados no município de Várzea Grande no período de 1998 (quando foi registrado o primeiro caso) até o ano de 2006 oscilou conforme os dados observados para todo o Estado de Mato Grosso e com os dados de números de casos no Brasil, disponíveis no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (Brasil, 2007). O município foi o que mais notificou casos de LV em Mato Grosso e foi o responsável pelo início da epidemia no Estado (Mestre e Fontes, 2007).

Tolezano *et al.* (2007) examinaram possíveis impactos de eventos climáticos interanuais como o *El Niño* sobre as variações anuais de LV no Brasil e concluíram que, em geral, no segundo ano após o início do evento do *El Niño*, registraram-se aumentos nas taxas de LV em todas ou quase todas as regiões geográficas do Brasil, exceto no ano de 1998, quando ocorreu declínio dos casos de LV, devido o advento *La Niña* de grande intensidade, apontando para a possibilidade de predição de risco e impacto de eventos climáticos sobre a LV. Os eventos climáticos *El Niño* foram registrados nos períodos de 1991-1993, 1994-1995, 1997-1998 e 2001-2003.

A **prevalência de cães soropositivos** nas áreas pesquisadas mostra que apesar da urbanização da LV, essa doença ainda conserva algumas características de ambientes rurais como áreas de criação de animais e agricultura de subsistência, como observado por Moura *et al.* (1999) no município vizinho Cuiabá/MT e por Barbosa *et al.* (1999) em Paraty/RJ.

A permanência de animais susceptíveis na área pode ter sido possibilitada pelo diagnóstico de cães utilizando-se técnicas de baixa sensibilidade e especificidade, aliada a outros fatores como inquéritos sorológicos irregulares e falta de treinamento das equipes executoras, como observado por Silva *et al.* (2005b) no estado do Rio de Janeiro, que sugeriram a necessidade da execução dos inquéritos sorológicos caninos serem realizados bimensalmente, visando o diagnóstico rápido da doença. As ações de vigilância canina compreendem a investigação do foco, busca ativa de cães sintomáticos, monitoramento que envolve o inquérito sorológico amostral para áreas sem transmissão e inquérito censitário para as áreas com transmissão (Brasil, 2005b).

A baixa eficiência dos testes diagnósticos utilizados no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral e o tempo para a liberação dos resultados interferem na qualidade do controle da doença. Bisugo *et al.* (2007) recomendam a necessidade de diferentes metodologias para a realização do diagnóstico da LV canina e sugerem o teste rápido rK39 como método de triagem mais específico.

Conforme Resende *et al.* (2006), a **distribuição de *L. longipalpis*** coincide com a ocorrência de **casos humanos**, sendo esta associação utilizada para validar a autoctonia dos casos. A sobreposição de ocorrência de casos humanos em relação as maiores densidades de flebotomíneos nos anos de 2004 a 2006 não foi significativamente observada no município de Várzea Grande, segundo Mestre e Fontes (2007) isto deve ocorrer devido ao tempo de incubação da doença, que é variável de doente para doente, assim como o tempo que o enfermo leva para buscar a assistência médica após ter sido infectado. Camargo-Neves *et al.* (2007b) não observaram correlação entre a ocorrência de LV humana e a densidade do vetor no estado de São Paulo. Barata *et al.* (2004) e Souza *et al.* (2004) observaram a associação entre a

densidade de flebotomíneos, a ocorrência de casos humanos e a presença de animais domésticos em Porteirinha e Belo Horizonte/MG. Monteiro *et al.* (2005) e França-Silva *et al.* (2005) relacionaram a presença de grande densidade vetorial e a elevada taxa de prevalência de LV canina em Montes Claros e Porteirinha/MG, respectivamente.

Moreno *et al.* (2005) e Oliveira e Araújo (2003) não observaram a correlação entre a presença de **cães sorologicamente positivos** com a presença da **infecção humana** em General Carneiro e Sabará/MG e em Feira de Santana/BA, respectivamente, embora estudos de Margonari *et al.* (2006) e de Oliveira *et al.* (2001) em Belo Horizonte/MG, de Callado *et al.* (2001) em General Carneiro e Sabará/MG e de Camargo-Neves *et al.* (2001) em Araçatuba/SP tenham relatado a existência de tal associação. Margonari *et al.* (2006) observaram que a transmissão da doença em humanos ocorre em áreas de alta prevalência de cães infectados e grande número de flebotomíneos, e que áreas com diferenças na vegetação e na distribuição de renda da população, pareceram não influenciar na ocorrência e na emergência da LV em Belo Horizonte/MG.

A detecção de um padrão de distribuição da LV, a proposição de medidas preventivas como controle químico do vetor e eliminação de cães soropositivos necessita de análise sistemática que possibilite avaliar o impacto dessas medidas.

Os fatores de risco identificados por Moreno *et al.* (2005) para a infecção de *L. (L.) infantum chagasi* e ocorrência de casos humanos em áreas urbanas, estão associadas às condições do ambiente no entorno das residências, principalmente relacionada à presença de matéria orgânica, à presença de animais no peridomicílio e ao contato de susceptíveis com os flebotomíneos vetores. Os cães são infectantes para o vetor e podem propagar a doença mesmo estando assintomáticos. Em cães sintomáticos, a exposição cutânea pelas feridas ou perda dos pelos facilita a infecção dos flebotomíneos, pois a *Leishmania* possui intenso tropismo pela pele.

A presença do vetor da *L. (L.) infantum chagasi* na periferia das cidades que registraram grandes números de casos de LV humana e elevadas taxas de infecção

canina sugerem a transmissão urbana da endemia em Mato Grosso. Em Várzea Grande, cujo surgimento de núcleos residenciais nas periferias urbanas do município, decorrentes da migração de população de baixa renda, proporcionaram condições favoráveis para a transmissão da LV, como a destruição de ecótopos silvestres, o intenso convívio do homem com animais domésticos e as precárias condições de moradia, de coleta de lixo e de saneamento básico, com transmissão da doença nos ambientes peri e intradomiciliar (Mestre e Fontes, 2007).

A observação de uma **taxa mínima de infecção natural** de flebotomíneos em Várzea Grande, a partir de estudos moleculares foi de 0,71%. Em outros estudos, foi determinada uma taxa de infecção natural de 2,6% em Mato Grosso do Sul (Nascimento *et al.*, 2007); 0,4% na Amazônia maranhense (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006); 2,0% no estado do Rio de Janeiro (De Pita-Pereira *et al.*, 2005), 6,10% em Barcarena/PA (da Silva *et al.*, 2005d), 1,50% na Bahia (Miranda *et al.*, 2002), 5,40% na Grécia (Aransay *et al.*, 2000), 7,70% na Venezuela (Rodriguez *et al.*, 1999), 0,30% no Rio Grande do Sul (Silva e Grunewald, 1999) e 0,16% no Brasil Central (Galati *et al.*, 1996). Souza *et al.* (2004) obtiveram resultados negativos em 100% das amostras analisadas em Belo Horizonte/MG. Com dissecação manual, a taxa de infecção foi de 1,14% em Teresina/PI (Silva *et al.*, 2005c) e chegou a 43,70% no estado do Amazonas (Silva *et al.*, 2005a).

Apesar da baixa taxa de infecção no vetor, a alta densidade de *L. longipalpis* no peridomicílio é importante para o aumento do risco de transmissão da doença, considerando-se ainda, sua alta capacidade vetorial e sua alta antropofilia.

Os estudos moleculares são ainda incipientes em Mato Grosso, embora Andrade *et al.* (2005a) tenham utilizado sondas de radionucleotídeos de DNA para estudos da leishmaniose tegumentar americana no Estado. É fundamental conhecer a distribuição do vetor infectado para se compreender a eco epidemiologia da doença e subsidiar medidas de controle. A grande densidade de *L. longipalpis* indica a necessidade de controle da população de vetores, para se delinear as ações de vigilância da doença no estado de Mato Grosso;

Como a taxa de infecção de *Leishmania* no vetor é considerada baixa na natureza, mesmo em áreas endêmicas para LV, a alta densidade de *L. longipalpis* no peridomicílio torna-se crucial para o aumento do risco de transmissão da doença (Deane e Deane, 1955b; Sherlock e Miranda, 1992), considerando-se ainda, sua alta capacidade vetorial (Killick-Kendrick, 1990) e sua alta antropofilia (Soares e Turco, 2003).

A utilização de técnicas moleculares permite um aumento da sensibilidade e da especificidade da identificação do parasito, embora seja importante avaliar a padronização dos métodos utilizados na conservação da amostra e na extração do DNA (Paiva *et al.*, 2007).

São múltiplas as infecções que têm determinantes nas atividades humanas como a invasão de áreas florestais, atividades rotineiras em horários inadequados, habitações precárias, criação de animais domésticos próximo às residências, que podem propiciar a infecção dos homens e fortalecendo seu conceito de zoonose. Assim sendo, o homem estabelece comunidades que propiciam a instalação de agentes infecciosos, além da existência e ação de mecanismos que propiciem essa associação. De acordo com Brasil (2002), o comportamento epidemiológico da LV é cíclico, com elevações de casos em períodos médios a cada cinco anos. Os estudos da variação do sazonal de *L. longipalpis* são necessários para subsidiar um programa do controle integrado, com determinação do período do ano mais favorável para a aplicação de inseticidas que pode acarretar em redução expressiva do número de flebotomíneos em torno de 40% (Dias *et al.*, 2007b), visando a utilização racional dos recursos e a redução nos danos ambientais em consequência deste controle da zoonose.

A investigação epidemiológica é necessária para definir local provável de infecção, verificar se a área é endêmica ou de novo foco, conhecer as características epidemiológicas do caso, orientar medidas de prevenção e controle, conforme situação epidemiológica e de acordo com a classificação da área pesquisada (Brasil, 2005b) e levando-se em conta as diferenças microambientais de cada região (Silva *et al.*, 2005b).

As três amostras submetidas ao PCR-RFLP foram identificadas com padrão de *L. (L.) infantum chagasi*. A PCR de material amplificado de minicírculos de kDNA é extremamente sensível, embora possam ocorrer falsos positivos, causados por contaminação. Estudos demonstraram que cerca de 25% das reações apresentam contaminação (Volpini *et al.*, 2004). A contaminação pôde ser evitada e acompanhada através da utilização de rígidos controles negativos, e controle interno a partir da utilização de iniciadores para amplificar o gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos (De Pita-Pereira *et al.*, 2005).

A existência de práticas agrárias, exploração do solo, interrupção da vigilância epidemiológica, processo migratório e de urbanização, áreas sem condições de moradia adequada, presença de cães infectados, elevada densidade vetorial, taxa de infecção dos vetores e a vulnerabilidade de susceptíveis, são fatores que contribuem para o aumento do risco de transmissão da LV ao ser humano, no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesse trabalho torna possíveis as seguintes conclusões:

1) O município de Várzea Grande/MT apresenta uma fauna bastante diversificada, evidenciando a presença 22 espécies do gênero *Lutzomyia* e uma espécie do gênero *Brumptomyia*;

2) Os flebotomíneos ocorreram em todos os bairros pesquisados;

3) A ocorrência da maior quantidade de machos no peridomicílio confirma a teoria da formação dos “leks”;

4) A grande densidade de *L. longipalpis* e a ocorrência em todos os meses do ano sugerem a sua participação no ciclo de transmissão da *Leishmania (L.) infantum chagasi*;

5) A espécie *L. longipalpis* apresentou preferência pelo ambiente peridomiciliar;

6) A ocorrência de *L. longipalpis* no ambiente intradomiciliar sugere o processo de domiciliação da espécie;

7) Foi observada uma tendência não significativa entre a densidade dos vetores e as variáveis bioclimáticas precipitação, umidade relativa do ar e temperatura;

8) As fêmeas de *L. longipalpis* demonstraram-se ecléticas, mas alimentaram preferencialmente em aves;

9) Na área pesquisada, não foi observada relação significativa entre a distribuição de *L. longipalpis*, a ocorrência de casos humanos e a presença de cães sorologicamente positivos;

10) A determinação da taxa mínima de infecção natural de fêmeas de *L. longipalpis* na área estudada foi de 0,71%;

11) Os meses mais favoráveis para o primeiro ciclo de tratamento químico no município pesquisado são os meses de outubro, novembro e dezembro, quando as condições bioclimáticas favorecem o aumento da densidade populacional de *L. longipalpis*, devendo ser repetido após três ou quatro meses, totalizando dois ciclos anuais de tratamento.

12) A capacidade endofílica de *L. longipalpis* e a possibilidade de transmissão intradomiciliar de LV sugerem que o controle químico intradomiciliar pode ter um importante impacto na redução da transmissão da doença;

8. ANEXOS

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/MT

Artigo 1:

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil.

Nanci Akemi Missawa e Edelberto Santos Dias.

Enviado para Memórias do Instituto Oswaldo Cruz em 22/05/2007.

Artigo 2:

Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Nanci Akemi Missawa, Elias Seixas Lorosa e Edelberto Santos Dias.

Enviado para Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em 14/04/2007.

Artigo 3:

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis transmission area in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil.

Nanci Akemi Missawa, Érika Monteiro Michalsky e Edelberto Santos Dias.

Enviado para Acta Tropica em 13/11/2007.

8.1 Anexo 1

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/MT



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
Escola de Saúde Pública de Mato Grosso
Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/SES/MT

Protocolo nº176/2006-CEP/SES-MT

Data do recebimento: 10/03/2006

Revisão das pendências: 09/05/06

Ofício nº130/06 - CEP/SES-MT

Cuiabá, 09 de maio de 2006.

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso analisou o protocolo de pesquisa intitulado “Epidemiologia da transmissão de Leishmaniose Visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no período de 2003 a 2005”, após correções das pendências, enquadrado na categoria “Aprovado”.

Atenciosamente,


Valdete Marques Arnaut Antiquera
Coordenadora do CEP/SES-MT

Ilm^ª Sr^ª.

Nanci Akemi Missawa

8.2 Anexo 2

Artigo: Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil.

Autores: Nanci Akemi Missawa e Edelberto Santos Dias.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Enviado em 22/05/2007

Recebido em 06/06/2007

Aceito em 20/12/2007

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil

Nanci Akemi Missawa, Edelberto Santos Dias* /[†]

Laboratório de Entomologia, Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil *Laboratório de Leishmanioses, Instituto de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

Visceral leishmaniasis (VL) has been naturally transmitted in periurban areas due to the emergence and reemergence of its vectors in such areas. Aimed to further knowledge on ecological aspects affecting the occurrence of phlebotomine sand flies in VL transmission areas in the municipality of Várzea Grande, state of Mato Grosso (MT), Brazil, sand fly captures were carried out. Monthly collections of sand flies were undertaken with CDC light-traps, which were left in both intradomiciliary and peridomiciliary areas of ten residences during four consecutive days between January 2004 and June 2006. Twenty-two species of genus Lutzomyia and one of Brumptomyia were captured. The most abundant species was Lutzomyia longipalpis (65.23%), followed by L. evandroi (16.26%), L. lenti (7.69%), L. whitmani (4.92%), L. sallesi (2.34%) and L. termitophila (1.32%). The highest density of the main VL vector, L. longipalpis, was found in peridomiciliary areas, mostly males. No significant correlation was found between environment (temperature, air relative humidity and rain fall) and phlebotomine density; although a slight increase in sand fly density has been observed in the period following rainfalls, particularly L. longipalpis. No correlation was observed between distribution and density of L. longipalpis, prevalence of human VL cases and the presence of serologically positive dogs. The presence of infected dogs, increased vector density, susceptibility rate and interruption of epidemiological surveillance may raise the risk of VL transmission to man in Várzea Grande.

Key words: Phlebotomine - *Lutzomyia longipalpis* - Várzea Grande - Mato Grosso

Leishmaniasis are regarded as one of the main world zoonosis, and visceral leishmaniasis (VL), particularly, constitutes an important anthroponosis or anthrozoosis when man acts as a reservoir. The disease is worldwide spread and is found in Americas, Africa, Southern Europe, Asia and Midwestern countries (Lainson & Shaw 1987). In Americas, VL is prevalent from Mexico to Argentina, and Brazil accounts for 90% of the cases in the continent (Soares & Turco 2003). Changes in human behavior and the environment may exert greater impact in the prevalence and pattern of VL transmission.

In Brazil, VL was previously known as a rural disease in several states, including Goiás, Tocantins and Mato Grosso do Sul (MS) (Marzochi & Marzochi 1994), and the first report of the disease in the country was made in 1913 in Mato Grosso (MT) (Alencar & Dietze 1991). Despite the fact that VL prevalence is underestimated, Brazil has recorded increasing incidences of the disease in the last 20 years (Dantas-Torres & Brandão-Filho 2006). Approximately 3,000 clinical cases a year have been recorded in the country with average mortality between 8% and 10% (Gontijo & Melo 2004).

Urbanization conditions of the disease and environmental changes influencing VL transmission can be of natural or anthropogenic origin (Barata et al. 2005, Monteiro et al. 2005), including human activities expansion, habitat fragmentation and deforestation, which have led to an increasing adaptation of the parasite, as well as of phlebotomine sand flies (Marzochi & Marzochi 1994). Thus, this metaxenic disease has been naturally transmitted in periurban areas due to the emergence and reemergence of its vectors in such areas (Tauil 2006). Recent data have confirmed urbanization of the disease in large urban centers (Silva et al. 2001, Bevilacqua et al. 2001, Souza et al. 2004, Monteiro et al. 2005, Barata et al. 2005); add to this the fact that some investigators (Bevilacqua et al. 2001) have suggested that socio-economical factors may be one of the determinant factors for VL transmission in Brazil.

Dogs are regarded as important reservoirs in several VL foci in both rural and periurban areas (Marzochi & Marzochi 1994, Silva et al. 2001). Several reports have correlated human VL with the presence of high canine seroprevalence (Deane & Deane 1955, Lainson & Shaw 1987, Oliveira et al. 2001); in addition, the disease occurrence has been associated with the sheer abundance of vectors (Vieira & Coelho 1998).

In Brazil, VL transmission is associated with a variety of sand fly species, and *Lutzomyia longipalpis* is the main vector species (Lainson & Rangel 2003). *L. cruzi* has been implicated in VL transmission in MS (Santos et al. 1998), being found naturally infected in the municipality of Jaciara, in MT (unpublished observations). Other phlebotomine species, such as

Financial support: Instituto René Rachou/Fiocruz

[†]Corresponding author: edel@cpqrr.fiocruz.br

Received 6 June 2007

Accepted 20 December 2007

L. forattini and *L. almerioi*, may also be associated with the disease in MS, both anthropophilic, although has not been evidenced its vectorial ability (Galati et al. 1997, Galati et al. 2006), whereas in the state of Para, *L. antunesi* is considered an alternative VL vector (Lainson & Rangel 2003). In Colombia, *L. evansi* has been reported to be the most likely VL vector (Travi et al. 1990). The VL etiologic agent is a protozoan parasite of the family Tripanosomatidae, species *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Lainson & Rangel 2005, Shaw 2006).

Most environmental factors affecting the epidemiology of leishmaniases provide evidence on the adaptation of parasites and their vectors to ecological changes due to socio-environmental processes such as deforestation and urbanization. Because these parasites and vectors adapt to modified environmental conditions in order to survive, the epidemiological profile of the disease has also undergone modifications (Marzochi & Marzochi 1994).

Hence, the present study was aimed at furthering knowledge on ecological aspects influencing density, seasonal fluctuation, endophilia and exophilia of phlebotomine sand flies in a VL transmission area in the municipality of Várzea Grande, MT.

MATERIALS AND METHODS

The municipality of Várzea Grande (VG) (15° 32' 30" S 56° 17' 18" W) is known as the industrial town of MT, Brazil. With a population of 214,842 inhabitants (IBGE 2000 apud Ferreira 2001), the town, together with the state capital Cuiabá, comprises the so called Urban Conglomerate of Cuiabá or Metropolitan Region of Cuiabá. VG is at 185m of altitude and has a territorial extension of 949.53km². It is in the central-south zone of the Mesoregion of MT, microregion of Cuiabá, with a subhumid tropical climate and annual rainfall of 1,750 mm. The rainy period runs between September and April with greater intensity from January to March. The yearly average temperature is 24°C, reaching up to 34.1°C, and absolute maximum temperatures may be over 42°C. The minimum average temperature in July, the coldest month, is 16.7°C. The geomorphologic figure of the municipality is mostly represented by Planalto da Casca and Depressão Cuiabana. Low amplitudes predominate in the region with altitudes ranging from 146 to 250 m in the city area. The predominant vegetation is the savannah, from its bushy form to the densest forests along water streams (Piaia 2003). VG has reported both canine and human VL cases since 1998. The transmission area ranges from the districts of Eldorado and São Matheus to Parque Sabiá (Fig. 1). The area under study, including dwellings, was chosen based on previous entomological surveys (Hueb et al. 2000, Ribeiro & Missawa 2002), studies on VL incidence and prevalence rates in man, according to which the municipality was regarded as an area of intense VL transmission in 2003. In the study area, the residents have low socio-economical conditions and dwellings show no basic sanitation, regular garbage collection and electric current. A survey in the area revealed that dogs and chickens were present in 100% of house surroundings, followed by other domestic animals such as ducks, turkeys, pigs, horses, cows, cats, and due to the presence of sites of garbage concentration named "lixões"

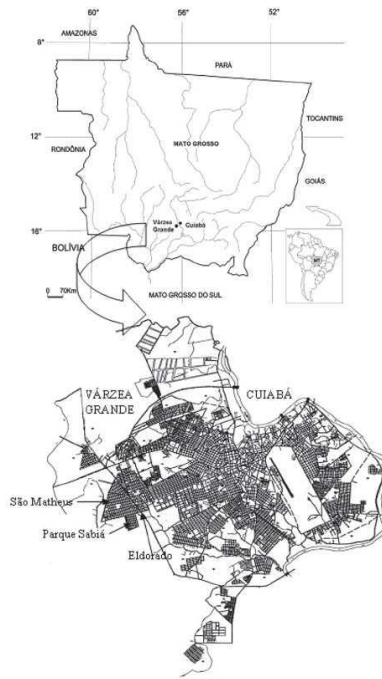


Fig. 1: geographic location and map of the municipality of Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil, and identification of the districts under study (Eldorado, São Matheus and Parque Sabiá).

surrounding the districts that are close to rural areas, it is very likely that rodents and skunks are present in peridomestic areas.

Phlebotomine captures were carried out between January 2004 and June 2006 at VG by means of CDC light traps (Sudia & Chamberlain 1962). The light traps were monthly left in the study sites during four consecutive nights, totaling 12 h of insect collection. Sand fly captures were performed in 10 residences, out of which three were located in the district of Eldorado, four in São Matheus and three in Parque Sabiá. Two CDC light traps were placed in each house, one indoors (bedroom) and the other outdoors (backyard and in animal shelters). During the study period, insecticide substances were not applied both in the study area and in the municipality. The captured insects were killed with ethyl acetate, clarified and identified according to the classification by Young and Duncan (1994) at the Laboratory of Entomology of the state Health Secretary of MT, with posterior

confirmation through reference specimens deposited in the Laboratory of Leishmaniases of René Rachou Institute (Belo Horizonte). Damaged insects could be identified at the level of genus as either *Lutzomyia* spp. or *Brumptomyia* sp.

Bioclimatic data of temperature, air relative humidity (ARH) and precipitation were obtained at the 9th District of Meteorology at VG. Coefficient of determination (R^2) for simple linear regression analysis was used to estimate variables between the environmental and phlebotomine density.

RESULTS

The number of 22 species of phlebotomine sand flies of the genus *Lutzomyia* França, 1924 and one species of the genus *Brumptomyia* França and Parrot, 1921 were captured and identified as in Table I. Out of 12,833 captured phlebotomine sand flies, 8,484 were males (66.11%) and 4,349 females (33.89%). Table I depicts the percentage of each species found and the distribution of sand flies captured indoors (1840; 14.34%) and outdoors (10,993; 85.66%). *L. longipalpis* showed to be the predominant species. The relative frequency of species showed to be: *L. longipalpis* (65.23%), *L. evandroi* (16.26%), *L. lenti* (7.69%), *L. whitmani* (4.92%), *L. sallesi* (2.34%),

L. termitophila (1.32%) and others (2.24%). The insects showed preference for the peridomiliary environment, whereas *L. longipalpis* was present both indoors and outdoors, most males in both sites. Some of the species were captured every month during the study period, namely: *L. evandroi*, *L. longipalpis*, *L. sallesi* and *L. whitmani*.

The distribution of phlebotomine sand flies in each district studied was: 3,037 phlebotomine sand flies in Eldorado (23.66%), 6,303 in São Matheus (49.12%) and 3,493 in Parque Sabiá (27.22%). The insects were more abundant in the peridomiliary area in São Matheus. The following species were present in the three districts throughout the entire period under study: *L. cerradincola*, *L. evandroi*, *L. hermanlenti*, *L. lenti*, *L. longipalpis*, *L. lutziana*, *L. sallesi*, *L. saulensis*, *L. sordellii*, *L. teratodes*, *L. termitophila*, *L. whitmani* and *B. brumpti*.

No significant correlation between dependent (temperature, ARH and precipitation) and independent variables (phlebotomine sand flies) was observed ($R^2 = 0.1672, 0.1044$ and 0.2653 , respectively; $p \geq 0.05$). Nevertheless, a slight increase in the density of insects was observed, especially *L. longipalpis*, following the rainy season (with the highest ARH between October and March), but not significantly correlated (Figs 2 and 3). No significant correlation between distribution and den-

TABLE I
Phlebotomine sand flies belonging to genera *Lutzomyia* and *Brumptomyia* distributed by sex and the place where they were collected in the municipality of Várzea Grande, state of Mato Grosso, from January 2004 to June 2006

Species	Indoors		Outdoors		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>L. acantopharynx</i> Martins, Falcão and Silva	4	4	2	3	13	0.10
<i>L. aragai</i> (Costa Lima)	-	1	-	-	1	0.01
<i>L. carmelinoi</i> Ryan, Fraiha, Lainson and Shaw	2	-	1	1	4	0.03
<i>L. cerradincola</i> Galati, Nunes, Oshiro and Dorval	1	2	4	1	8	0.06
<i>L. corumbaensis</i> Galati, Nunes, Oshiro and Rego	1	-	-	-	1	0.01
<i>L. dendrophyla</i> (Mangabeira)	-	1	-	2	3	0.02
<i>L. evandroi</i> (Costa Lima & Antunes)	150	162	952	823	2087	16.26
<i>L. flaviscutellata</i> (Mangabeira)	-	3	2	5	10	0.08
<i>L. hermanlenti</i> Martins, Silva and Falcão	1	-	1	3	5	0.04
<i>L. lenti</i> (Mangabeira)	39	36	621	291	987	7.69
<i>L. longipalpis</i> (Lutz & Neiva)	853	264	5142	2112	8371	65.23
<i>L. longipennis</i> (Barreto)	-	-	-	2	2	0.02
<i>L. lutziana</i> (Costa Lima)	1	-	1	2	4	0.03
<i>L. punctigeniculata</i> (Floch & Abonnenc)	-	4	4	7	15	0.12
<i>L. sallesi</i> (Galvão & Coutinho)	46	77	78	99	300	2.34
<i>L. saulensis</i> (Floch & Abonnenc)	-	-	1	6	7	0.05
<i>L. scaffii</i> (Damasceno & Aronck)	-	-	-	1	1	0.01
<i>L. sordellii</i> (Shannon & Del Ponte)	21	21	13	34	89	0.69
<i>L. teratodes</i> Martins, Falcão and Silva	3	10	7	13	33	0.26
<i>L. termitophila</i> Martins, Falcão and Silva	18	30	32	89	169	1.32
<i>L. walkeri</i> (Newstead)	-	-	5	2	7	0.05
<i>L. whitmani</i> (Antunes & Coutinho)	47	22	385	178	632	4.92
<i>Lutzomyia</i> spp.	-	1	3	2	6	0.05
<i>B. brumpti</i> (Larrousse)	6	6	24	23	59	0.46
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	3	13	3	19	0.15
Sub-Total	1193 (9.30%)	647 (5.04%)	7291 (56.81%)	3702 (28.85%)	12833	100
Total	1840 (14.34%)		10993 (85.66%)		12833	100

sity of *L. longipalpis*, occurrence of human VL cases and serologically positive dogs was observed (Table II).

DISCUSSION

The predominance of *L. longipalpis* found in the present study showed to be in accordance with Missawa and Lima (2005) in the same municipality and other localities as reported by Oliveira et al. (2003, 2006) for Campo Grande, MS, Resende et al. (2006) and Souza et al. (2004) for Belo Horizonte, state of Minas Gerais (MG), Barata et al. (2004, 2005), and França-Silva et al. (2005) for Porteirinha, MG, Monteiro et al. (2005) for Montes Claros, MG.

The insects' preference for the peridomiciliar area has also been observed in several Brazilian states (Barata et al. 2005, Monteiro et al. 2005, Souza et al. 2004, Resende et al. 2006), which provides evidence of the insect domiciliation influenced by human socio-ecological modifications in the sand fly habitat and the adaptive power of the insects' species (Oliveira et al. 2003, Aguiar & Medeiros 2003, Souza et al. 2004), although Resende et al. (2006) have observed roughly equal proportions of phlebotomine sand flies, mainly *L. longipalpis*, in both intra- and peridomiciliary areas.

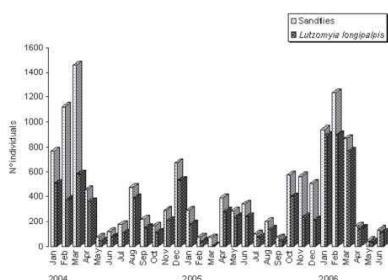


Fig. 2: seasonality of *Lutzomyia longipalpis* captured in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil, from January 2004 to June 2006.

TABLE II

Number of *Lutzomyia longipalpis*, human visceral leishmaniasis (VL) cases, prevalence of canine VL per district in Várzea Grande, state of Mato Grosso, from January 2004 to June 2006

District	<i>L. longipalpis</i> N	%	Human VL infection	VL Canine prevalence (%)
Eldorado	808	9.65	0	4.55
São Matheus	4958	59.23	1	9.30
Parque Sabiá	2605	31.12	0	21.29
Total	8371	100	1	11.40

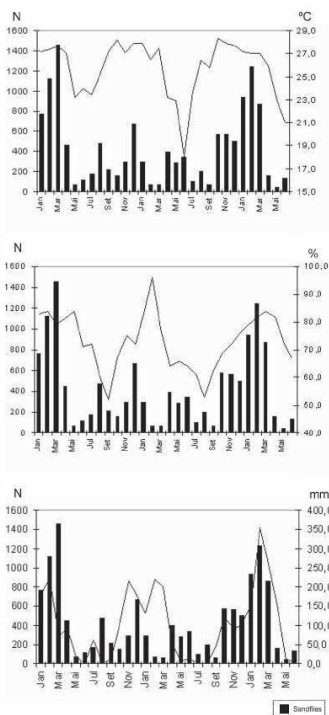


Fig. 3: specimens of phlebotomine sand flies captured correlated with average temperature (°C), air relative humidity (%) and precipitation (mm³) in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil, from January 2004 to June 2006.

The peridomestic distribution of insects observed here may be due to the fact that high rates of sand flies were found inside domestic animal shelters, where phlebotomine sand flies may form abundant aggregates on stationary animals such as dogs and poultry (Lainson & Rangel 2003), probably because of caïromones produced by male insects in order to attract females to feed and copulate.

Considering the fact that *L. longipalpis* is able to adapt to different habitats (Young & Duncan 1994, Barata et al. 2005), one may infer that VL transmission may be taking place into the dwellings and that such species is prone to anthropophily (Rebêlo et al. 1999). The closeness between the houses and the domestic animal shelters may account for the presence of insects indoors together with their capacity of endophilia. The high frequency of male insects found in both intra- and peridomiciliary areas has corroborated data provided by

Oliveira et al. (2003, 2006), Resende et al. (2006), Barata et al. (2004, 2005), evidencing the high adaptation capacity of sand flies enabling the disease transmission. The process of urbanization of insects and, consequently, of the disease is correlated with disorganized urban growth, followed by human migration from rural to urban regions and the environmental destruction. Add to this social crises and environmental changes such as prolonged and periodical droughts enabling new VL foci in urban areas (Vieira & Coelho 1998).

The non-significant correlation between insect density and the bioclimatic variables under study had also not been observed by Souza et al. (2004) in Belo Horizonte, and Rebêlo (2001) in São Luis, state of Maranhão. The non-significant effect of temperature on phlebotomine density was reported by Barata et al. (2004), although Monteiro et al. (2005) have found correlations between high temperatures and peaks of VL transmission. França-Silva et al. (2005) showed no correlation between vector density and the climatic variables, temperature and ARH. On the other hand, Resende et al. (2006) reported an increased number of phlebotomine sand flies, mainly *L. longipalpis*, when the combination of high temperature averages and regular rain periods occurred, as well as Monteiro et al. (2005), Barata et al. (2004) and Oliveira et al. (2003), who have associated phlebotomine density with the first rainy periods and high ARH.

Entomological studies on vectorial occurrence and density seek to provide information both qualitatively and quantitatively on phlebotomine sand flies, VL potential transmitters. They are aimed at further defining prevalence areas and the best period to be surveyed in order to be followed up and assessed in attempts to control sand flies through either physical or chemical methods.

The prevalence of VL-seropositive dogs in the areas under study show that despite VL urbanization, the disease still retains some rural features in areas of animals breeding and subsistence agriculture as observed by Moura et al. (1999) in the neighbor municipality of Cuiabá, MT. The permanence of susceptible animals in the area might have been enabled by canine misdiagnoses provided by low sensitivity and specificity techniques used so far.

According to Resende et al. (2006), the pattern of distribution of *L. longipalpis* coincides with the occurrence of human VL cases, and such correlation has been used to validate autochthony of the cases. Correspondence between human VL cases and high phlebotomine density was not observed between 2004 and 2006 in VG, although Barata et al. (2004) and Souza et al. (2004) have measured correlations between phlebotomine density, prevalence of VL human cases and presence of domestic animals in Porteirinha and Belo Horizonte, MG. Monteiro et al. (2005) and França-Silva et al. (2005) have correlated the presence of high vector density and high VL canine prevalence in Montes Claros and Porteirinha, MG.

The risk factors for *L. (L.) infantum chagasi* infection and the occurrence of human VL cases in urban areas, identified by Moreno et al. (2005), are associated with the environment surrounding residences, mainly with the presence of organic matter, domestic animals in peridomiciliary areas and the contact between sus-

ceptible hosts and phlebotomine vectors. Dogs are regarded as infective for phlebotomine vectors even when they are asymptomatic. In symptomatic dogs, the exposure to cutaneous infections and hair loss enable contamination of sand flies, since *Leishmania* has high tropism for the skin. The existence of agricultural practices for soil cultivation, interruption of epidemiological surveys, migratory processes and disorganized urbanization, areas with low living conditions, presence of infected VL dogs, high vector density and infection, and host susceptibility to VL transmission raise the risk of human infection in VG.

ACKNOWLEDGEMENTS

To technicians of the Laboratory of Entomology and the Regional Office of the State Secretary of Health of Mato Grosso, and the residents of the dwellings surveyed in the municipality of Várzea Grande for their collaboration, friendship and support.

REFERENCES

- Aguiar GM, Medeiros WM 2003. Distribuição e Habitats. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255.
- Alencar JE, Dietze R 1991. Leishmaniose visceral (Calazar). In R Veronesi, *Doenças infecciosas e parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 706-717.
- Barata RA, França da Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, de Paula EV, Prata A, Monteiro EM, Dias ES 2004. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 481-487.
- Barata RA, França da Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Loroza ES, Fiuza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 421-425.
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS 2001. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53: 1-8.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 151-156.
- Deane LM, Deane MP 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital* 48: 61-76.
- Ferreira JCV 2001. *Mato Grosso e seus Municípios*, Buriiti, Cuiabá, 660 pp.
- França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Silva JC, Dias ES 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 131: 213-220.
- Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Damasceno-Júnior GA 2006. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 175-193.

- Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saude Publica* 31: 378-390.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.
- Hueb M, Camiá RP, Ribeiro LC, Fontes CJF 2000. Calazar em Mato Grosso – Foco Recente em Área Periurbana. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 85-92.
- Lainson R, Rangel EF 2003. Ecologia das Leishmanioses. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-309.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-827.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick, *The leishmaniasis in biology and medicine*, Academic Press, London, p. 1-20.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10: 359-375.
- Missawa NA, Lima GBM 2005. Levantamento dos vetores das leishmanioses no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no ano de 2004. Caderno de resumos do XVI Encontro de Biólogos do CRBio-1, Campo Grande, MS, p. 104.
- Monteiro EM, França da Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152.
- Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro MC 2005. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in a urban area of Minas Gerais state. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 456-463.
- Moura ST, Fernández CGN, Pandolpho VC, Rodrigues e Silva R 1999. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 36: 123-126.
- Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP 2003. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saude Publica* 19: 933-944.
- Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espindola IAC, Dorval MEC, Brazil RP 2006. 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* 101: 869-874.
- Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad Saude Publica* 17: 1231-1239.
- Piaia II 2003. *Geografia de Mato Grosso. A urbanização do Estado*, 3rd ed., Edunic, Cuiabá, 130 pp.
- Rebêlo JMM 2001. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 17: 221-227.
- Rebêlo JMM, Araújo J, Carvalho M, Oliveira ST, Silva FS 1999. Flebotomos (Diptera, Phlebotominae) da ilha de São Luís, zona do Golfo Maranhense, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 247-53.
- Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto NMN, Oliveira CDL, Pessanha JE, Cunha MCM, Brandão ST 2006. Sazonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 51-55.
- Ribeiro ALM, Missawa NA 2002. Spatial distribution of phlebotomine species in the state of Mato Grosso, Brazil, in the period of 1996 to 2001. *Entomol Vect* 9: 33-34.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RU, Malacco MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317.
- Shaw JJ 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 577-579.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiúza VOP, Brazil RP 2001. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 285-291.
- Soares RPP, Turco SJ 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *An Acad Bras Cienc* 75: 303-330.
- Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 795-803.
- Sudia WA, Chamberlain RW 1962. Battery-Operated light trap: an improved model. *Mosquito News* 22: 126-129.
- Tauil PL 2006. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 275-277.
- Travi BL, Velez ID, Brutus L, Segura I, Jamarillo C, Montoya J 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in Colombian foci in the Pacific coast region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 676-677.
- Vieira JBF, Coelho GE 1988. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 85-92.
- Young DG, Duncan MA 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*, Associated Publishers American Entomological Institute, Florida, 881 pp.

8.3 Anexo 3

Artigo: Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Autores: Nanci Akemi Missawa, Elias Seixas Lorosa e Edelberto Santos Dias.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Enviado em 14/04/2007

ACEITO

Edelberto Santos Dias

De: "Revista" <rsbmt@rsbmt.ufm.edu.br>
Para: <edel@cpqrr.fiocruz.br>
Enviada em: terça-feira, 8 de janeiro de 2008 12:13
Anexar: oledata.mso
Assunto: decl-2748



REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

DECLARAÇÃO

Em nome do Prof. Prof. Alúzio Prata (Editor/RSBMT), declaro que o **Artigo** "Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, Brasil", de autoria de Nanci Akemi Missawa, Elias Seixas Lorosa e **Edelberto Santos Dias**, foi submetido à publicação na **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** e encontra-se em processo de análise.

Uberaba, 8 de janeiro de 2008

Sueli de Melo Bueno
Secretária/RSBMT

Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR - A FIOCRUZ em Minas Gerais.
Rene Rachou Research Center/CPqRR - The Oswaldo Cruz Foundation in the State of Minas Gerais-
Brazil.

8/1/2008

Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, Brasil

Host preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis, municipality of Várzea Grande, State of Mato Grosso, Brazil

Nanci Akemi Missawa^{1 2}, Elias Seixas Lorosa³ e Edelberto Santos Dias²

RESUMO

Estudos dos hábitos alimentares e do conteúdo intestinal dos flebotomíneos permitem a identificação dos hospedeiros, indicando os potenciais reservatórios das leishmanias. O presente estudo objetivou determinar a preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* e sua relação com a transmissão da leishmaniose visceral. As capturas mensais foram realizadas em área de transmissão de leishmaniose visceral, município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006, utilizando-se armadilhas de luz CDC. Foram capturadas 2376 fêmeas, das quais 104 (4,38%) estavam ingurgitadas, sendo 32 (30,77%) capturadas no intradomicílio e 72 (69,23%) no peridomicílio. Após reação de precipitina, observou-se que as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentaram-se preferencialmente em aves (30,77%) e roedores (21,15%), mas também foram encontradas alimentadas de sangue de humanos, gambás, bois, cavalos e cães, demonstrando o caráter oportunista da espécie.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*. Leishmaniose Visceral. Preferência Alimentar. Precipitina.

ABSTRACT

Studies of the feeding habits and the intestinal content of sand flies allows the identification of hosts, indicating the potential reservoirs of the leishmanias. The present study intends to determine the host preference of *Lutzomyia longipalpis* and its relation with the transmission of the visceral leishmaniasis. The captures were performed monthly in the transmission area of visceral leishmaniasis, municipality of Várzea Grande, State of Mato Grosso, from January 2004 to June 2006 using CDC light traps. Among the 2376 that were captured females, of which 104 (4.38%) were bloods feeding. Between those, 32 individuals (30.77%) were captured in the intradomicile and 72 (69.23%) in the peridomicile. After precipitin reaction if

was observed that *Lutzomyia longipalpis* females had preferential feed in birds (30.77%) and rodents (21.15%), but had been also found feeding from blood of human beings, opossums, oxen, horses and dogs, demonstrating the opportunist character of the species.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*. Visceral Leishmaniasis. Host Preference. Precipitin Test.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) possui distribuição mundial, sendo encontrada nas Américas, África, sul da Europa, Ásia e Oriente Médio¹⁴. Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que o Brasil contribui com 90% dos casos do continente^{13 24 27}. Nesse continente, as leishmanioses têm algumas características epidemiológicas comuns, ocorrendo em pessoas residentes em áreas rurais ou que tiveram contato com habitats silvestres. As mudanças no comportamento humano, as alterações do ambiente, ou ambas, podem ter um maior impacto na prevalência e no padrão de transmissão da LV¹².

No Brasil, a doença atingia as populações rurais de todos os estados, inclusive Goiás, Tocantins e Mato Grosso do Sul¹⁷, sendo que o primeiro caso humano foi registrado em 1913 em Mato Grosso³. Apesar da conhecida subestimação de casos, o Brasil registrou um aumento na incidência da doença nos últimos 20 anos⁸. A LV constitui um problema crescente de saúde pública no país e encontra-se em franca expansão geográfica estando distribuída em 19 estados e em 1551 municípios no período de 1994 a 2002. Têm sido registrados aproximadamente 3.000 casos/ano no país, com letalidade média de 8% a 10%¹¹.

As alterações ambientais ocasionadas pelo homem e como consequência a dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos insetos, causa a adaptação de muitas espécies a diferentes ambientes¹⁰. A proximidade do homem a zonas de floresta e a criação de animais domésticos atrai grande número de espécies de flebotomíneos ao

peridomicílio. Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um perigo constante como vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos^{5 6 26}.

A infecção do vetor *Lutzomyia longipalpis*, ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, das formas amastigostas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* presentes na derme do hospedeiro infectado, as quais passarão a evoluir no trato digestivo anterior do inseto para formas promastigotas²¹. Ao exercer o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado, o flebotomíneo inocula as formas promastigotas infectantes presentes em seu trato digestivo anterior²³, diferenciando-se na forma amastigota que se dissemina pelos tecidos dos vertebrados³⁰.

Esses insetos alimentam-se de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre eles o homem¹⁸. O estudo do comportamento alimentar e do conteúdo intestinal dos flebotomíneos permite a identificação dos hospedeiros, indicando os potenciais reservatórios das leishmanias.

O presente estudo teve como objetivo determinar a preferência alimentar de *L. longipalpis* e sua relação com a transmissão da LV no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

O município de Várzea Grande (Figura 1) é a cidade industrial do estado de Mato Grosso e possui população de 214.842 habitantes (IBGE, 2000). Com extensão territorial de 949,53km² e altitude de 185m, localiza-se entre as coordenadas 15°32'30" latitude sul e 56°17'18" longitude oeste. Geograficamente localiza-se na mesorregião centro-sul do Estado, microrregião Cuiabá e possui clima tropical quente e sub-úmido e precipitações de 1750 mm, com maior intensidade em janeiro, fevereiro e março. A temperatura média anual é de 24°C,

sendo maior máxima 42°C, e menor mínima 0°C. Entre as principais atividades econômicas destacam-se a indústria de transformação e comércio forte. A agricultura é de subsistência e a pecuária é pelo sistema de cria, recria e corte⁹.

As coletas foram realizadas em área de transmissão de LV, localizada no município de Várzea Grande, MT, no período de janeiro de 2004 a junho de 2006 com armadilhas de luz CDC²⁵. As armadilhas foram instaladas mensalmente, durante quatro noites consecutivas em 10 residências, sendo duas por residência, uma no peridomicílio (quintal e/ou abrigos de animais) e a outra no intradomicílio (quarto/dormitório).

Os insetos capturados foram sacrificados com acetato de etila e as fêmeas ingurgitadas foram congeladas a -7°C para paralisação do processo digestivo. Posteriormente elas foram dissecadas para triagem e confirmação da espécie *L. longipalpis*. No teste de precipitina, realizado no Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, o conteúdo do tubo digestivo de cada fêmea foi triturado em solução salina a 0,85% e o macerado foi resfriado durante 12 horas à temperatura de 4 a 8°C. Depois de centrifugado por 5 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi confrontado com anti-soros de boi, cão, cavalo, porco, roedor, ave e homem, segundo metodologia específica¹⁵.

RESULTADOS

Foram capturadas 2376 fêmeas no período da pesquisa, das quais 104 foram encontradas ingurgitadas, representando 4,38%. Das 104 fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas, 32 (30,77%) foram capturadas no intradomicílio e 72 (69,23%) no peridomicílio.

A Tabela 1 apresenta a reação do conteúdo intestinal das fêmeas ao teste de precipitina, onde podemos observar a alimentação exclusiva em determinado hospedeiro ou mista em diferentes hospedeiros.

As fêmeas de *L. longipalpis* alimentaram-se preferencialmente em aves (30,77%) e roedores (21,15%), mas também foram encontradas alimentadas de sangue de humanos, gambás, bois, cavalos e cães (Figura 2).

DISCUSSÃO

A busca por fontes de alimentação é uma resposta comportamental que afeta a reprodução e a densidade populacional das espécies de flebotomíneos. Assim, dependendo do seu grau de adaptação às condições ambientais modificadas pelo homem, algumas espécies podem ser mais facilmente encontradas em ambientes peridomiciliares⁴.

Em Várzea Grande, observou-se a preferência alimentar de *L. longipalpis* por aves, sendo que essa atração também foi observada no estado do Rio de Janeiro² e em Porteirinha/MG⁴. Na Serra da Bodoquena/MS, 72% de *L. longipalpis* capturados foram reagentes para aves mediante técnica imunoenzimática do Elisa¹⁶, embora a associação entre a infecção de *L. (L.) chagasi* e a presença de galinhas ou galinheiros no estado de Minas Gerais não tenha sido observada¹⁹.

O considerável número de *L. longipalpis* alimentado com sangue humano, seja exclusivamente ou combinado com sangue de outros animais (ave e cão), evidencia o caráter antropofílico da espécie. O caráter oportunista podendo sugar ampla variedade de vertebrados foi também relatado em Porteirinha/MG⁴ onde foi observada a preferência de fêmeas de *L. longipalpis* por aves e cavalos, mas também se alimentando de sangue de roedores, cães, bois e do homem, o caráter eclético foi observado também no município de Raposa/MA²².

Em pesquisa de preferência alimentar com oferta de diferentes animais para o repasto sanguíneo, foi observado que 95% de todos os flebotomíneos capturados em cavalos eram *L. longipalpis*, atraindo muito mais insetos que os outros animais ofertados²⁸.

A atração de *L. longipalpis* por cães foi destacada na Costa Rica²⁹, o que não foi observada nesta pesquisa e em outros trabalhos²⁰. Apesar da baixa porcentagem de fêmeas que se alimentou em cães (5/104), a presença de gambás no peridomicílio, atuando como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre, pode aumentar o risco da infecção canina em 2,6 vezes⁷. A fonte alimentar dos vetores propiciam informação sobre a preferência por hospedeiros em circunstâncias naturais. A intensidade da antropofilia é um dos fatores essenciais na avaliação da capacidade vetorial, enquanto a atração por outros hospedeiros pode dar respostas sobre a associação entre vetores potenciais e reservatórios naturais¹, permitindo o planejamento de estratégias de prevenção e controle da LV.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos técnicos do Laboratório de Entomologia e do Escritório Regional de Saúde da Baixada Cuiabana da Secretaria de Saúde de Mato Grosso pelos trabalhos de campo e aos moradores das casas pesquisadas no município de Várzea Grande/MT pela valiosa colaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 21:1816-1820, 2005.
2. Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Feed preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 583-584, 1987.

3. Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8ª ed. Edit. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 706-717, 1991.
4. Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 421-425, 2005.
5. Barbosa GM, Marzochi MCA, Massard CL, Lima GPS, Confort EM. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 15:641-646, 1999.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2003.
7. Cabrera MAA, De Paula AA, Camacho LAB, Marzochi CA, Aguiar GM, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45:79-83, 2003.
8. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48:151-156, 2006.
9. Ferreira JCV. Mato Grosso e seus Municípios. Editora Buriti. Cuiabá/MT, 2001.
10. Gomes AC, Barata JM, Rocha e Silva EO, Galati EA. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. Anthropophilic Phlebotomus fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 31:32-39, 1989.

11. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:338-349, 2004.
12. Grimaldi-Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6:230-250, 1993.
13. Grimaldi-Jr G, Tesh RB, Pratt DM. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Clinical Microbiology Reviews* 41:687-725, 1989.
14. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *In: Peters & Killick-Kendrick. The leishmaniasis in biology and medicine*, London. Academic Press 1:1-20, 1987.
15. Lorosa ES, Andrade RE. Identificação de fontes alimentares de mosquitos no município de Nova Iguaçu, RJ, Brasil, pela técnica da reação de precipitina. *Entomología y Vectores* 5:85-92, 1998.
16. Marassá AM, Consales CA, Galati EAB, Nunes VLB. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:183-186, 2006.
17. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 10:359-375, 1994.
18. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:147-152, 2005.

19. Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro MC. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais state. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:456-463, 2005.
20. Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sandfly at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 68-75, 1993.
21. Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11^a ed. Edit. Atheneu. São Paulo, 2005.
22. Passos-Dias FO, Lorosa EL, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública* 19:1373-1380, 2003.
23. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 69: 100-103, 1989.
24. Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 303-330, 2003.
25. Sudia WA, Chamberlain RW. Battery-Operated light trap: an improved model. *Mosquitoes News* 22:126-129, 1962.
26. Vexenat JA, Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiological characteristics of american cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the state of Bahia. III. Phlebotomine fauna. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81:293-301, 1986.
27. WHO. World Health Organization. Lucha contra las leishmaniasis. Série Informe Técnico 793, 1990.
28. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:427-432, 1999.

29. Zeledon R, Murrillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecologia de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 79: 455-459, 1984.
30. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperatura in development of *Leishmania* parasites. Annual Review of Microbiology 48: 449-470, 1994.

Figura 1. Área de estudo: município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Figura 2. Preferência alimentar de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no período de janeiro de 1998 a junho de 2006.

Tabela 1. Fêmeas de *L. longipalpis* submetidas ao teste de precipitina com utilização de diferentes anti-soros, por ambiente, no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no período de janeiro de 1998 a junho de 2006



Figura 1

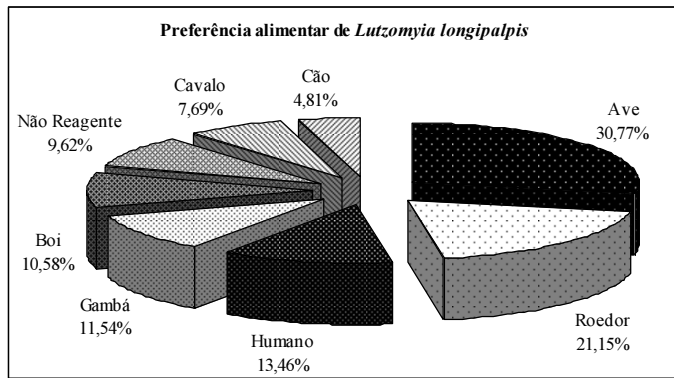


Figura 2

Tabela 1

Anti-soro	Intra	Peri	Número absoluto
Ave	6	19	25
Boi	2	7	9
Cão	0	2	2
Cavalo	4	4	8
Gambá	6	6	12
Humano	5	7	12
Roedor	4	12	16
Ave e Cão	0	2	2
Ave e Humano	0	1	1
Ave e Roedor	1	3	4
Boi e Roedor	1	1	2
Cão e Humano	0	1	1
Não Reagente	3	7	10
Total	32	72	104

8.4 Anexo 4

Artigo: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis transmission area in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil.

Autores: Nanci Akemi Missawa, Érika Monteiro Michalsky e Edelberto Santos Dias.

Acta Tropica

Enviado em 13/11/2007

EM AVALIAÇÃO

De: Acta Tropica
Data: 11/14/07 08:50:23
Para: nanci.am@terra.com.br
Assunto: A manuscript number has been assigned: ACTROP-D-07-00456

Ms. Ref. No.: ACTROP-D-07-00456
Title: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis transmission area in Varzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil

Acta Tropica

Dear Dra Nanci Akemi Missawa,

Your submission entitled "*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis transmission area in Varzea Grande state of Mato Grosso, Brazil" has been assigned the following manuscript number: ACTROP-D-07-00456.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/actrop/>.

Your username is: nanci
Your password is: missawa622522

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Conor Lovett
Journal Manager
Acta Tropica

***Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) naturally infected with *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in a visceral leishmaniasis
transmission area in Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil**

Nanci Akemi Missawa^a, Érika Monteiro Michalsky^b & Edelberto Santos Dias^{b*}

^aLaboratório de Entomologia. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso. Av. Adauto Botelho, s/n°. Parque da Saúde. Bairro CoopHEMA. Cuiabá. Mato Grosso. Brasil. CEP. 78.085-200.

^bLaboratório de Leishmanioses. Centro de Pesquisas René Rachou. Instituto Oswaldo Cruz. Av. Augusto de Lima, n°. 1715. Barro Preto. Belo Horizonte. Minas Gerais. Brasil. CEP 30.190-002.

* Corresponding Author: Phone: (31) 3349-7700 Extension number 7758. Fax: (31) 3295-3115. E-mail: edel@cpqrr.fiocruz.br (E.S. Dias).

ABSTRACT

The technique of polymerase chain reaction (PCR) associated to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used for identifying the infection rate of *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Monthly captures of sand flies were undertaken in a visceral leishmaniasis (VL) transmission area in the municipality of Várzea Grande, state of Mato Grosso (MT), Brazil, using CDC light-traps, which were left in both intradomiciliary and peridomiciliary areas between January 2004 and June 2006. For PCR assays a pool of 10 phlebotomine individuals was used for DNA extraction, which was confirmed by amplification of the constitutive specific gene (cacophony), and PCR positive results were submitted to PCR-RFLP. Amplification of *Leishmania* spp. specific DNA products were observed in 3 out of the 42 samples. Such molecular approach has allowed us to infer a natural infection index of 0.71%, and *L. (L.) infantum chagasi* showed to be infective to *L. longipalpis*.

Key-Words: *Lutzomyia longipalpis*. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. PCR. RFLP. Natural Infection. Mato Grosso.

1. INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) etiological agents are protozoan parasites of the family Tripanosomatidae, genus *Leishmania*; three species are responsible for the disease worldwide namely: *Leishmania (Leishmania) donovani* in Asia, *L. (L.) infantum* in Asia, Europe and Africa, and *L. (L.) infantum chagasi* in Americas (Lainson and Rangel, 2003; Shaw, 2006).

Although the main VL vector in Brazil is *Lutzomyia longipalpis* (Lainson and Rangel, 2003), other vector species have been reported in literature such as *L. forattini*, *L. almerioi* (Galati et al., 1997) and *L. cruzi* (Santos et al., 1998) that have been implicated in the disease transmission in the state of Mato Grosso do Sul; the latter species was found naturally

infected in the municipality of Jaciara, in the state of Mato Grosso. In Para, *L. antunesi* is regarded as an alternative vector species (Lainson and Rangel, 2003). In Colombia, *L. evansi* was reported as a possible VL vector (Travi et al., 1990).

Among the methodologies used for screening naturally infected phlebotomine sand flies, the technique of polymerase chain reaction (PCR) has been widely reported in literature for such aim (Rodriguez et al., 1999, Miranda et al., 2002, De Pita-Pereira et al., 2005 and Oliveira-Pereira et al., 2006). One of the pioneer investigators in this field, Rodgers et al. (1990) used PCR for detecting *Leishmania* kDNA. Recently, Michalsky et al. (2002) and Paiva et al. (2007) assessed the performance of this molecular tool for identification of experimentally infected sand flies.

As for species identification, polymerase chain reaction associated with restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used by Volpini et al. (2004) in order to differentiate between *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) amazonensis*. Paiva et al. (2004) used PCR to identify *Viannia* subgenera and, Andrade et al. (2001), in order to differentiate the *L. mexicana* and *L. braziliensis* complexes, used the same technique. More recently, these authors (Andrade et al., 2005 and 2006) differentiated the species *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum chagasi* in canine samples. One of techniques to provide intern control of DNA extraction and PCR for accurate species identification involves the use of specific primers directed to the phlebotomine constitutive gene (cacophony) (De Pita-Pereira et al., 2005).

The detection of *Leishmania* spp. in naturally infected phlebotomine sand flies is of fundamental importance for incriminating them as possible insect vectors providing further epidemiological data on the disease (Michalsky et al., 2002).

In this context, the present study was aimed to determine the natural infection rate of *L. longipalpis* with *L. (L.) infantum chagasi* through PCR and PCR-RFLP analysis in VL transmission areas of the municipality of Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study area

The municipality of Várzea Grande (Figure 1) is a town of the state of Mato Grosso, Brazil, with a population of 214,842 inhabitants. Together with the state capital, Cuiabá, Várzea Grande comprises the Metropolitan Region of Cuiabá. At the altitude of 185m, latitude 15°32'30" S and longitude 56°17'18" W, the territorial extension of Várzea Grande is 949.53km² with a tropical climate and annual rainfall of 1750 mm. The rainy period runs between September and April with greater intensity from January to March. The yearly average temperature is 24°C, reaching up to 34.1°C, and the absolute maximum temperature may be over 42°C. The geomorphologic figure of the municipality is mostly represented by *Planalto da Casca* and *Depressão Cuiabana*. The woody flora named *cerrado* (savannah-like vegetation) is predominant in the region (Ferreira, 2001).

2.2. Phlebotomine captures and identification

Phlebotomine captures were carried out between January 2004 and June 2006, in the municipality of Várzea Grande, MT, using CDC light traps (Sudia and Chamberlain 1962). These traps were placed in peridomiciliary areas of 5 residences, in a visceral leishmaniasis area of transmission. The captured insects were identified according to the classification by Young and Duncan (1994). Pools of 10 female *L. longipalpis* were frozen and dried in microcentrifuge tubes at -20°C.

2.3. *Leishmania spp.* DNA extraction

Isolation of DNA was undertaken according to Souza et al. (2004) and Michalsky et al. (2002) through grinding. Lysis buffer solution (50 µl) was added (100mM Tris-HCL, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8,0), and the samples were digested at 37°C overnight in the presence of 1 µl proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (10mg/ml). To accomplish DNA extraction with phenol-chloroform (Ausubel et al., 1992), a volume of 70 µl sterile Milli Q[®] water (Millipore, Billerica, MA, US) and 120 µl of buffer-saturated phenol were homogenized vigorously for 20 seconds and then centrifuged at 14,000 g for 5 minutes at room temperature. The supernatant was transferred to another microcentrifuge tube followed by another extraction step, as previously described, and then added to 70 µl of ultra-pure water and 120 µl of phenol (saturated in buffer solution). Next, the samples were treated with 120 µl isoamyl chloroform (24:1) and DNA was precipitated at -20°C overnight, before being added to 20 µl of sodium acetate 3M pH 5.2 and 200 µl cold absolute ethanol. The precipitate was washed with 100 µl of 70% cold ethanol and DNA was then re-suspended in 30 µl of TE 1x and stored at -20°C. Concentration and degree of purity of the DNA was estimated by spectrophotometer reading (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech) at 260 to 280 nm.

2.4. *Polymerase chain reaction (PCR)*

A number of 42 samples were amplified through PCR using the automate thermocycler (Perkin-Elmer-Gene Amp PCR System 2400) in Hot Start procedure. The reactions were prepared with 5 µl buffer solution (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 9.0), 5 µl dNTPs at 2mM each, 2 µl of each primer (200 ng/µ) each and 0.5 µl de Taq DNA polymerase (Invitrogen) (2.5 U/µl) and 26.5 µl of ultra-pure water. After prepared, 2 µl of DNA were added to them at a concentration of 10 ng/µl per reaction and the following

primers were used: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'; 5'CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; 5'GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' (Degrave et al., 1994). The following schedule for amplification was kept: 94°C for 5 minutes, followed by 35 denaturation cycles at 94°C for 30 seconds; annealing at 50°C for 30 seconds; extension at 72°C for 30 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes (Michalsky et al., 2002). In every PCR reaction set, both negative (no DNA) and positive controls (purified kDNA purified added to the reference strain *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903)), were included. After amplification, the samples were submitted to electrophoresis (SDS-PAGE) and PCR products were visualized on 6% silver stained polyacrylamide gels (Pinheiro et al. 1999). A volume of 5 µl standard molecular weight PhiX 174RF was added as size marker.

2.5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of Polymerase chain reaction (PCR) amplified products

Positive PCR samples were submitted to PCR-RFLP aimed to distinguish among *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum chagasi* according to previous literature protocol (Volpini et al., 2004). *Leishmania* reference samples used were *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930) and *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75). Three microliters of PCR amplified products were added to 1 µl buffer solution, 5.9 µl Milli Q[®] water, 0.1 µl of the two endonucleases, HaeIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and ApaLI (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) for enzymatic digestion for 3 h and 30 min at 37 °C. To the digested product, a volume of 10 µl of the sample buffer was added (TA) 2x (400 µl DDW; 200 µl TA 6x), TA 6x (bromophenol blue 0.25%, xilenocianol 0.25%, glycerol PA 30%). Restriction fragments were run in 10% polyacrylamide gels as previously described. Molecular size markers were used in

a volume of 4 µl and 8 µl of each sample were placed in each lane. The gels were 2% silver stained.

2.6. Polymerase chain reaction (PCR) of the specific constitutive gene (cacophony)

In order to have phlebotomine DNA extraction confirmed, a pair of specific primers for the *Lutzomyia* constitutive gene (cacophony) from the IV56 region was used: 5Llac 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' and 3Llac 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (Lins et al., 2002). The PCR amplification generated a product of 220 bp showing that this gene can be used as an accurate reaction control, in order to avoid false negative results. The reaction were undertaken in a final volume of 27 µl including Taq Polymerase Buffer 10X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4.5mM MgCl₂, 200µM of each dNTP (Invitrogen), 0.2 µl of each primer, 1.25 U Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem), 2 µl of DNA sample and ultra filtered water. PCR reactions were carried out in an automate thermocycler (Perkin-Elmer-Gene Amp PCR System 2400) in Hot Start procedure at 94°C for 12 minutes for denaturation, followed by 35 denaturation cycles at 94°C for 30s, annealing at 55°C for 30s and a extension at 72°C. After the last cycle, a final extension step followed at 72°C for 10s for final annealing. Afterwards, the samples were submitted to electrophoresis (SDS-PAGE) and PCR products were visualized on 10% polyacrylamide gels stained with silver at 2%. A volume of 5 µl standard molecular weights PhiX 174RF was added as size marker.

2.7. Calculation of the minimal infection rate

As the samples comprised pools of 10 female insects each, to calculate the minimal *L. longipalpis* infection rate the following formula was used: Infection rate (IR) = number of

positive pools x 100 / total number of insects; for which one infected insect was taken into account.

3. RESULTS

3.1. *Leishmania* spp. DNA in naturally infected *L. longipalpis*

Amplification of specific 120 bp products was observed in the samples identified as 2, 4 and 7 depicted in Figure 2. The remaining samples showed no *Leishmania* spp. DNA amplification.

Upon taking into account three PCR-positive female sand flies among a total of 420 individuals, the natural infection rate was inferred as being approximately 0.71%. Possibly false negative results were assessed by analyzing PCR reproducibility including all samples.

3.2. *L. (L.) infantum chagasi* DNA detection in naturally-infected *L. longipalpis*

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was carried out in the samples 2, 4 and 7 using the restriction enzymes ApaI and HaeIII, including DNA reference samples of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi*. The ApaI endonuclease is capable of digesting only *L. (V.) braziliensis* PCR products into two fragments, 88 bp and 32 bp, distinguishing among the 120 bp for both *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* (Andrade et al., 2006). The restriction enzyme HaeIII was used to digest the 120 bp fragment of *L. (V.) braziliensis* into two others, 80 bp and 40 bp, as well as of *L. (L.) infantum chagasi* into four, 120, 80, 60 and 40 bp (Andrade et al., 2006), but not of *L. (L.) amazonensis* (Volpini et al., 2004).

Analysis of DNA generated by restriction enzyme digestion of phlebotomine sand flies under study were compared with that from reference samples; the three samples were identified as *L. (L.) infantum chagasi* standard (Figure 3).

3.3. Phlebotomine DNA (cacophony)

All samples under study showed fragments of 220 bp (Figure 4) corresponding to the constitutive specific gene which is in accordance with data provided by De Pita-Pereira *et al.* (2005), evidencing efficacy of DNA extraction and PCR performance.

4. DISCUSSION

Our results allowed us to detect a phlebotomine natural infection rate of 0.71% in Várzea Grande, Mato Grosso, Brazil, based on molecular techniques. Other investigations have shown varying natural infection indices in Brazil, as follows: 2.6% in Mato Grosso do Sul (Nascimento *et al.*, 2007); 0.4% in the Amazon region of Maranhão (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006); 2.0% in the state of Rio de Janeiro (De Pita-Pereira *et al.*, 2005); 6.1% in Barcarena, state of Pará (Silva *et al.*, 2005c); 1.5% in Bahia (Miranda *et al.*, 2002); 0.3% in Rio Grande do Sul (Silva and Grunewald, 1999) and 0.2% in Brazil Central (Galati *et al.*, 1996). Remarkably, in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Souza *et al.* (2004) evidenced 100% of PCR negative results in all samples under study. Through manual dissection, phlebotomine infection rates of 2% and 43.7% were found in Terezina, state of Piauí (Silva *et al.*, 2005b) and in the state of Amazonas (Silva *et al.*, 2005a), respectively. In other countries, screening of phlebotomine sand flies for detection of natural infection rates has shown 7.7% in Venezuela (Rodríguez *et al.*, 1999) and 5.4% in Greece (Aransay *et al.*, 2000).

Since *Leishmania* infection rates are known to be low in the insect vector, even in VL endemic areas, evidences of high densities of *L. longipalpis* in peridomiliary areas have shown a high risk of the disease transmission as the vector is highly anthropophilic (Soares and Turco, 2003).

The samples analyzed in the present study through PCR-RFLP were identified by using the *L. (L.) infantum chagasi* standard. Although false negative may occur due to contamination, amplification of *Leishmania* kDNA has shown to be highly sensitive. According to Volpini et al. (2004), approximately 25% of PCR procedures are contaminated.

Contamination in our PCR results was precluded through negative controls as well as internal control used for amplifying the specific constitutive gene (cacophony), through which DNA extraction efficacy was confirmed (De Pita-Pereira *et al.*, 2005).

The use of molecular techniques for parasite identification may provide highly sensitive and specific results, although the methodologies used for DNA extraction standardization should be assessed (Paiva et al., 2007). The use of such techniques for epidemiological surveys may provide information on new VL infection foci and epidemiological features of particular cases so that control measures may be designed according to the microenvironmental characteristics of the region.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technicians of the *Laboratório de Entomologia* and the *Escritório Regional de Saúde da Baixada Cuiabana* of the *Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso* for field captures; the technicians of the *Laboratório de Leishmanioses* of *Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ* for laboratory work and support; the local surveyed residents of the municipality of Várzea Grande, MT for collaboration and friendship.

6. REFERENCES

- Andrade, A.S.R., Fernandes, O., Hueb, M., Carvalho, M.L.R., Fontes, C.J. and Melo, M.N.; 2005. The use of radionuclide DNA probe technology for epidemiological studies of tegumentary leishmaniasis in Mato Grosso State. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 201-204.
- Andrade, A.S.R., Gomes, R.F., Fernandes, O. and Melo, M.N.; 2001. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 78, 261-267.
- Andrade, H.M., Reis, A.B., Santos, S.L., Volpini, A.C., Marques, M.J. and Romanha, A.J.; 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 140, 231-238.
- Aransay, A.M., Scoulica, E. and Tselentis, Y.; 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933-1938.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.; 1992. *Short protocols in molecular biology*. 2 ed. New York, John Wiley.
- De Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., Barbosa, A.F. and Britto, C.C.; 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905-913.
- Degrave, W., Fernandez, O., Campbell, B., Bozza, M. and Lopez, U.G.; 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 463-469.

- Ferreira, J.C.V.; 2001. Mato Grosso e seus Municípios. Editora Buriti. Cuiabá/MT. 660 pp.
- Galati, E.A., Nunes, V.L., Dorval, M.E., Oshiro, E.T., Cristaldo, G., Espindola, M.A., da Rocha, H.C. and Garcia, W.B.; 1996. Study of the phlebotomines (Diptera: Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Saúde Públ. 30, 115-128.
- Galati, E.A.B., Nunes, V.L.B., Rego Jr, F.A., Oshiro, E.T. and Chang, M.R.; 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Saúde Públ. 31, 378-390.
- Lainson, R. and Rangel, E.F.; 2003. Ecologia das Leishmanioses. *In*: Rangel, E.F. and Lainson, R. (Eds). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 311-336.
- Lins, R.M.M.A., Oliveira, S.G., Souza, N.A., Queiroz, R.G., Justiniano, S.C.B., Ward, R.D., Kyriacou, C.P. and Peixoto, A.A.; 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. Insect Mol. Biol. 11, 117.
- Michalsky, E.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C. and Dias, E.S.; 2002. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* sp. em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 44, 255-259.
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriber, A., Gonçalves, M., Reis, M.G., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-Neto, M. and Barral, A.; 2002. 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 97, 185-188.
- Nascimento, J.C., Paiva, B.R., Malforte, R.S., Fernandes, W.D. and Galati, E.A.B.; 2007. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 49, 119-122.

- Oliveira-Pereira, Y.N., Rebelo, J.M.M., Moraes, J.L.P. and Pereira, S.R.F.; 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39, 540-543.
- Paiva, B.R., Passos, L.N., Falqueto, A., Malafronte, R.S. and Andrade Jr, H.F.; 2004. Single step Polymerase Chain Reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 46, 335-338.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Andrade Júnior, H.F. and Malafronte, R.S.; 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia de polimerase. Cad. Saúde Públ. 23, 87-94.
- Pinheiro, N.A., Moura, R.P., Monteiro, E. and Villa, L.L.; 1999. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. Braz. J. Med. Biol. Res. 32, 55-58.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J. and Wirth, D.F.; 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp. Parasitol. 71, 267-375.
- Rodriguez, N., Aguilar, C.M., Barrios, M.A. and Barker, D.C.; 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93, 47-49.
- Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.U. and Malacco, M.A.F.; 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 12, 315-7.
- Shaw, J.J.; 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 577-579.

- Silva, A.C.C., Silvia, D.F., Freitas, R.A., Silva, A.C., Castro, L.M. and Franco, A.M.R.; 2005a. Infecção natural e idade fisiológica de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de mata de terra firme da região nordeste de Manacapuru, AM. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 43
- Silva, J., Mendonça, I., Teixeira, T., Silva, M. and Costa, C.; 2005b. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* com *Leishmania chagasi* em área urbana de Teresina, PI. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 85.
- Silva, K.C.F., Souza, A.A.A., Silva, M.G.S., Lima, J.A.N., Barata, I.R., Silveira, F.T. and Ishikawa, E.A.T.; 2005c. Detecção de infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* pela reação em cadeia de polimerase (PCR) em *Lutzomyia longipalpis* de área endêmica de calazar no município de Barcarena, Pará. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 399
- Silva, O.S. and Grunewald, J.; 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 579-582.
- Soares, R.P.P. and Turco, S.J.; 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. An. Acad. Bras. Cienc. 75, 303-330.
- Souza, C.M., Pessanha, J.E., Barata, R.A., Monteiro, E.M., Costa, D.C. and Dias, E.S.; 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 795-803.
- Sudia, W.A. and Chamberlain, R.W.; 1962. Battery-Operated light trap: an improved model. Mosq. News 22, 126-129.
- Travi, B.L., Vélez, I.D., Brutus, L., Segura, I., Jamarillo, C. and Montoya, J.; 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in Colombian foci in the Pacific coast region. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 676-677.

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

Young, D.G. and Duncan, M.A.; 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers American Entomological Institute. Florida/ USA. 881 pp.

Figure 1

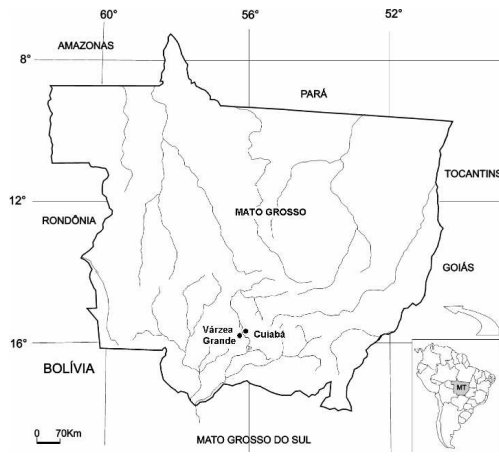


Figure 2

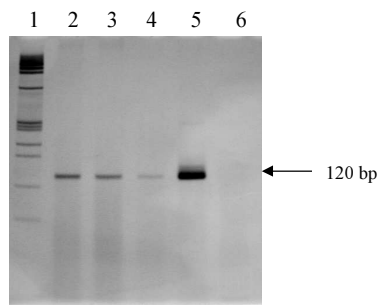


Figure 3

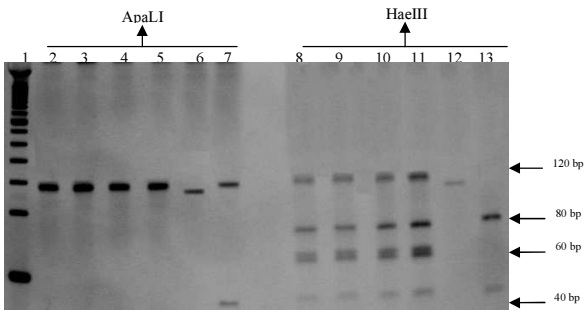


Figure 4

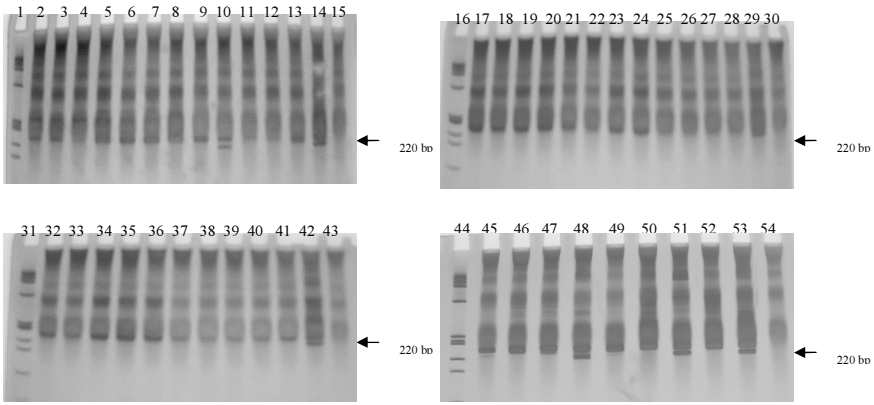


Figure 1. Geographic localization of Várzea Grande, state of Mato Grosso, Brazil.

Figure 2. PCR amplification products of positive phlebotomine samples (2, 4 and 7), using *Leishmania* spp. specific primers. 6% Polyacrilamide gel silver stained at 0.2%. 1 – PhiX 174 DNA marker; 2, 3 and 4 – samples 2, 4, and 7; 5 – Positive control and 6 – Negative control.

Figure 3. PCR amplification products of the conserved *Leishmania* kDNA after digestion with the restriction enzymes ApaLI and HaeIII (molecular size marker MM 50 bp) (Invitrogen). 6% Polyacrilamide gel silver stained at 0.2%. 1 – 50 bp DNA marker; 2, 3 and 4 – samples 2, 4 and 7; 8, 9 and 10 – samples 2, 4 and 7; 5 and 11 – Reference DNA *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75); 6 and 12 – Reference DNA *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8); 7 and 13 – Reference DNA *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930).

Figure 4. PCR amplification products of *Lutzomyia* constitutive gene (cacophony). Primers 5Llcaac/3Llcaac. 10% Polyacrilamide gel silver stained at 0.2%. 1, 16, 31 and 44 – PhiX 174 DNA marker; 2 to 13, 17 to 28, 32 to 41, 45 to 52 – samples 1 to 42; 14, 29, 42 and 53 – Positive controls; 15, 30, 43 and 54 – Negative controls.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cad Saúde Pública** 2005; 21(6): 1816-1820.

Aguiar GM, Schuback PA, Vilela ML, Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II-Distribuição vertical (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1985; 80:187-194.

Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1987; 82: 583-584.

Aguiar GM, Medeiros WM. **Distribuição e Hábitats**. In: Rangel EF, Lainson R, Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p. 207-55.

Aguiar CM, Fernandez E, Fernandez R, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera E, Souza WJS, Coutinho SG. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1998; 93: 15-16.

Alencar JE. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1961; 3: 175-180.

Alencar JE, Dietze R. **Leishmaniose visceral (Calazar)**. In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8ª ed. Edit. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 1991. p. 706-717.

Alvar J, Canavate C, Gutiérrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microb Rev** 1997; 10: 298-319.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol** 2004; 57: 1-87.

Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, Gonzales F, San Andres MD, Boggio J, Rodrigues F, Sainz A, Escacena C. Canine leishmaniasis, clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **An Trop Med Parasitol** 1994; 88: 371-378.

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

Alves W, Maia AN, Oliveira GM, Souza M, Costa W, Bonfim R. Leishmaniose visceral no Brasil: perfil dos casos no período de 2002 a 2004. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38(1): 489.

Alves WA, Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury ANS, Sena JM, Alencar Júnior LR. Avaliação do sistema de vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral (SVE-LV), Brasil, 2005. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 134.

Amóra SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, Rocha MFG. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciênc Rur** 2006; 36(6): 1854-1859.

Andrade AJ. **Avaliação de cairomônios na atratividade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Brejo do Mutambal, município de Varzelândia, MG.** Belo Horizonte (MG); 2006. Mestrado [Dissertação em Entomologia] – Universidade Federal de Minas Gerais.

Andrade ASR, Fernandes O, Hueb M, Carvalho MLR, Fontes CJ, Melo MN. The use of radionuclide DNA probe technology for epidemiological studies of tegumentary leishmaniasis in Mato Grosso State. **Bras Arch Biol Tech** 2005; 48: 201-204.

Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. **Vet Parasitol** 2006; 140(3-4): 231-238.

Andrade H, Reis A, Santos S, Marques M, Romanha A. PCR-RFLP identifica a presença de *Leishmania braziliensis* em cão de Belo Horizonte. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38(1): 305.

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

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66(5): 1933-1938.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol** 2000; **30** (12-13): 1269-1281.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. **Short protocols in molecular biology**. 2 ed. New York: John Wiley; 1992.

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

Badaró R, Nakatami M, Chun P, Reed GC. Novo teste rápido (30') para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. 30º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Salvador (BA); 1994.

Barata RA. **Aspectos entomológicos envolvidos na transmissão e controle da leishmaniose visceral americana no município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil**. Rio de Janeiro (RJ); 2005. Doutorado [Tese em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Barata RA, França da Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, de Paula EV, Prata A, Monteiro EM, Dias ES. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004; **99**(5): 481-487.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; **38**(5): 421-425.

Barbosa GM, Marzochi MCA, Massard CL, Lima GPS, Confort EM. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saúde Pública** 1999; **15**: 641-646.

Barufa G, Cury P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. **Rev Pat Trop** 1973; **2**: 345-361.

Bauzer LGSR, Souza NA, Maingon RDC, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2007; **102**(1): 1-12.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelyo, Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97: 645-647.

Belli A, Rodriguez B, Avile H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 1998; 58: 102-109.

Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. **Ins Sci appl** 1986; 7: 241-245.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2001; 53(1): 1-8.

Biancardi CMAB. **Contribuição ao estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado de Mato Grosso, município de Chapada dos Guimarães, Brasil.** Manaus (AM); 1996. Doutorado [Tese em Entomologia] – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas.

Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Cunha EA, Garcia AS, Spessoto JR M, Kaneto CN, Camargo CVO, Tolezano JE. Avaliação do teste rápido rK39 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 132.

Blum H, Beier B, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 1987; 8: 93-99.

Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, Figueiredo JFC, Silva GF, Cimerman S, Bacha HA, Teixeira MCL. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32(6):713-719.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Estudo dirigido sobre Leishmanioses.** Belo Horizonte; 1996. 27p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. **Capacitação de profissionais que atuam em sistemática de flebotomíneos.** Belo Horizonte; 2005a [Apostila]. 28p.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. – guia de bolso. 5ª ed. Brasília, DF; 2005b. 320p.

_____. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **B Elet Epidemiol** 2002; **2**(6): 1-11.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília; 2003. 122p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Brasília, Brasil; 2007. [Capturado 20 fev. 2007]. Disponível em: www.portal.saude.gov.br.

Boreham PF. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. **Am J Trop Med Hyg** 1975; **78**: 83-91.

Brecelj M, Pikelj F, Gubensek F, Anderluh G. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for detecting *Leishmania*. **Infection** 2000; **28**: 111-113.

Cabrera MAA, De Paula AA, Camacho LAB, Marzochi CA, Aguiar GM, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2003; **45**(Suppl 2): 79-83.

Callado ES, Moreno EC, Antunes CM, Wilke VML, Carneiro M. Correlação entre a infecção humana assintomática por *Leishmania chagasi* e a infecção canina em General Carneiro, Sabará, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001; **34**(Suppl 3): 151-152.

Camargo LB, Langoni H. Impact of leishmaniasis on public health. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis** 2006; **12**(4): 527-548.

Camargo ME, Rebonato C. Cross reactivity in fluorescent tests for *Trypanosome* and *Leishmania* antibodies. **Am J Trop Med Hyg** 1969; **18**: 500-505.

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

Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Gomes AC. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007a; 40 (suppl I): 136.

Camargo-Neves VLF, Rodas LC, Pauliquévis-Jr C, Scandar AS, Mayo RC, Bergo ES, Yasumaro S. Levantamento entomológico e monitoramento de *Lutzomyia longipalpis* no estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007b; 40 (suppl I): 138.

Camiá RP, Rinaldi J, Fontes CJF, Hueb M 1999. Foco de Leishmaniose Visceral em Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32(2): 127.

Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Ready PD, Davies CR. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Med Vet Entomol** 1999; 13: 209-211.

Carrera M. **Insetos de Interesse Médico e Veterinário**. Curitiba/PR: Editora UFPR; 1991. 228p.

Carvalho GML. **Flebotomíneos vetores e prevalência da leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Belo Horizonte (MG); 2006. Mestrado [Dissertação em Doenças Infecciosas e Parasitárias] – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Casanova C, Macoris MLG, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Costa AIP, Prado AP. Criadouros naturais de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área urbana endêmica para a leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007a; 40(suppl I): 115.

Casanova C, Costa AIP, Macoris MLG, Andrighetti MTM, Sampaio SMP. Dispersão de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área urbana endêmica para leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007b; 40 (suppl I): 116.

Catorze MGB. Leishmanioses e SIDA. **Med Cutan Iber Lat Am** 2005; 33(6): 237-250.

Cazemajor M, Landré C, Montchamp-Moreau C. The sex-ratio trait in *Drosophila simulans*: genetic analysis of distortion and suppression. **Genetics** 1997; 147: 635-642.

Cesse EAP, Carvalho EMF, Andrade PP, Ramalho WM, Luna L. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. **Rev Bras Saúde Matern Infant** 2001; 1(2): 167-176.
Choi C, Lerner E. Leishmaniasis. **J Inv Dermatol Symp Proc** 2001; 6: 175-182.

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região Sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1998; 31: 355-360.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, De Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Caceres E. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colômbia. **Am J Trop Med Hyg** 1989; 40: 480-486.

Costa CHN, Pereira HF, Pereira FCA, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJO. Is the household dog a risk factor for american visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1999; 93: 464.

Costa FSO. **Deteção de DNA de *Leishmania* spp. em roedores silvestres e sinantrópicos em área de transmissão das leishmanioses no município de Araçuaí, Minas Gerais, Brasil: o uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas implicações epidemiológicas.** Rio de Janeiro (RJ); 2002. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Costa LB, Bertúlio MA, Rodrigues H, Lima GBM, Ramos SR, Moraes Filho VC, Ribeiro ALM, Souza CO, Silva AM, Barros IM. Ocorrência de flebotomíneos vetores da leishmaniose visceral nos municípios do estado de Mato Grosso. **Rev Abrasco** 2003; 8(2): 639.

Costa JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gaz Méd Bahia** 2005; 75(1): 3-17.

Damasceno LS, Araújo Filho CJ, Vale EFN, Lobo TF, Nunes FR, Bandeira SP. Leishmaniose visceral como 1ª infecção oportunista em paciente com SIDA. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 109.

Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev Saúde Pública** 2006; 40(3): 537-541.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2006; 48(3): 151-156.

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

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital** 1955a; 48: 61-76.

_____. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1962; 4: 149-212.

_____. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital** 1955b; 47: 75-87.

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

Dedet JP, Pratlong F. **Leishmaniasis. Manson's tropical diseases**. Cook GCJ Zumba A Eds WB Saunders, 21^o ed. London; 2003. p.1339-1364.

De Luca AS, Vasconcelos HL, Barrett TV. Distribution of sandflies (Diptera: Phlebotominae) in forest remnants and adjacent matrix habitats in Brazilian Amazonian. **J Bras Biol** 2003; 63(3): 401-410.

De Marco TS. **Aspectos ecológicos dos flebotomíneos em recente foco de transmissão de leishmaniose tegumentar, na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, Brasil**. Belo Horizonte (MG); 2001. Doutorado [Tese em ecologia, conservação e manejo da vida silvestre] – Universidade Federal de Minas Gerais.

De Paula AA, Da Silva AVM, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **J Parasitol** 2003; 89 (suppl 4): 832-836.

De Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2005; 99(12): 905-913.

Degrave W, Fernandez O, Campbell B, Bozza M, Lopez UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1994; 89: 463-469.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infection: epidemiology in Europe. **Ann Trop Med Parasitol** 2003; 97 (suppl 1): S3-S15.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar do estado de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007a; 40(1): 49-52.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Vieira EP, Rocha MF, Michalsky EM, Costa DC, Barata RA. Impacto do uso de inseticida α -cipermetrina no controle da população de flebotomíneos no município de Montes Claros (MG), área de transmissão intensa de leishmaniose visceral. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007b; 40 (suppl 1): 133.

Di Lorenzo, Proietti FR, Assunção RM. A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil – uma breve revisão. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2000; 33 (suppl 1): 316-317.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg** 1996; 55: 125-130.

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

Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as will as disease. **Epidemiol Infect** 1993; 103: 647-656.

Elnaiem DEA, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME, Mekkawi AM, Connor SJ, Ashford RW, Thomson MC. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in Eastern Sudan. **Am J Trop Med Hyg** 2003; 68: 10-17.

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

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizoto MC, Perri SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clin Vet** 2000; 5: 36-44.

Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in the northern Venezuela. IV-Sandfly monthly fluctuation and leishmaniasis incidence relationship. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1987; 82: 177-179.

Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JBM, Falqueto A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of american cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; **96**: 1061-1067.

Ferreira EC, Melo LA, Prado IG, Quaresma PF, Melo MN, Cunha HM, Paglia AP, Diniz RFV, Madeira FAM, Linardi PM, Avelar D, Valério SAN, Gontijo CMF. Detecção de *Leishmania* sp. em mamíferos domésticos silvestres e sinantrópicos e em seus ectoparasitos na regional nordeste do município de Belo Horizonte – Resultados preliminares. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 137.

Ferreira ESC. A reação das precipitinas aplicadas aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. **An Insect Med Trop** 1945; **2**: 187-196.

Ferreira JCV. **Mato Grosso e seus Municípios**. Editora Buriti. Cuiabá/MT; 2001. 660p.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Silva JC, Dias ES. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitol** 2005; **131**: 213-220.

França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Mayrink W, Vilela EP, Costa JC, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol** 2003; **111**: 161-163.

Forattini OP. **Ecologia, Epidemiologia e Sociedade**. 2º ed. São Paulo: Edit. Edusp e Edit. Artes Médicas; 2004. 529p.

_____. OP. **Entomologia Médica**. Vol. I. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1962. 662p.

_____. OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no estado de São Paulo. **Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo** 1953; **7**: 158-167.

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

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

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1997; 31(4): 378-390.

Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. **Rev Sci Tech Off Int Epiz** 2004; 23: 661-676.

Gaspar E, Costa SCG, Nunes CC, Lemos R, Souza U, Brescanchin. Canine leishmaniasis: serological study in Mato Grosso state, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38(1): 344.

Gebree-Michael T, Malone JB, Balkew M, Ali A, Berhe N, Hailu A, Herzi AA. Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae) vectors of kala-azar in east Africa by use of geographic information systems. **Acta Tropica** 2004; 90: 73-86.

Gomes AC, Barata JM, Rocha e Silva EO, Galati EA. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. Anthropophilic *Phlebotomus* fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1989; 31:32-39.

Gomes PAF, Garcez LM, Goto H, Shaw JJ, Quinnell RJ, Courtenay O. Leishmaniose visceral humana em área de transmissão intensa no Pará: PCR e sorologia com antígenos recombinantes. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 131.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol** 2004; 7(3): 338-349.

Google earth. Brasil; 2006. [Capturado 15 mar 2006]. Disponível em <http://www.earth.google.com>

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

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

Grimaldi-Jr G, Tesh RB, Pratt DM. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Clin Microbiol** **1989**; **41**: 687-725.

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

Hernandez-Montes O, Monroy-Ostria A, Mc Cann S, Barker DC. Identification of mexican *Leishmania* species by analysis of PCR amplified DNA. **Acta Tropica** **1998**; **71**: 139-153.

Hueb M, Assis SB, Guimarães EED, Rosa DL, Fontes CJF. Ocorrência de transmissão autóctone de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop** **1996**; **29**(3): 281-282.

Hueb M, Camiá RP, Ribeiro LC, Fontes CJF. Calazar em Mato Grosso – Foco Recente em Área Periurbana. **Rev Soc Bras Med Trop** **2000**; **33**(1): 324-325.

Jandel B. **SigmaStat statistical user's manual**. Version 2.0. Jandel, San Rafael, CA; 1995.

Kerr SF, McHugh CP, Dronen Jr NO. Leishmaniasis in Texas: prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *Neotoma micropus*. **Am J Trop Med Hyg** **1995**; **53**: 73-77.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol** **1990**; **4**: 1-24.

Lainson R, Rangel EF. **Ecologia das Leishmanioses**. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro; 2003. p.291-309.

Lainson R, Shaw JJ. **Evolution, classification and geographical distribution**. In: Peters & Killick-Kendrick. The leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press. London; 1987. p.1-20.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **1987**; **81**: 517.

Lima BS, Carvalho MR, Brito MEF, Fittipaldi VC, Oliveira AP, Dietze R, Shaw JJ, Brandão-Filho SP. Uso do teste Kalazar Detect (K-39) em soros de roedores capturados em área endêmica para leishmaniose visceral, na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 140.

Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Mol Biol** 2002; 11(2): 117.

Lopez M, Ingá R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanoscuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction a simplified procedure for field work. **Am J Trop Med Hyg** 1993; 51: 348-356.

Lorosa ES, Andrade RE. Identificação de fontes alimentares de mosquitos no município de Nova Iguaçu, RJ, Brasil, pela técnica da reação de precipitina. **Entomol Vect** 1998; 5: 85-92.

Lucena FFA, Maia-Elkhoury ANS, Sousa A, Pereira GFM, Sousa-Gomes ML, Alves WA, Sena JM. Relacionamento probabilístico como ferramenta para identificar co-infecção leishmaniose visceral (LV) e AIDS no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 125.

Luitgards-Moura JF, Bermúdez EGC, Rosa-Freitas MG. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2000; 95(2): 251-257.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VO, Rabello AL. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001; 34: 249-254.

Maciel GBML. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral americana no estado de Mato Grosso, Brasil**. São Paulo (SP); 2005. Especialização [Monografia em Entomologia Médica] – Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo.

Maia-Elkhoury ANS, Sousa-Gomes ML, Lucena FFA, Alves WA, Sena JM, Paz LC. Co-infecção leishmaniose visceral (LV) e AIDS no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 124.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB, Nunes VLB. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi*

(Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; 39(2):183-186.

Marcondes CB. **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu; São Paulo. 2001. 432p.

Margonari CS. **As leishmanioses no município de Belo Horizonte: estudos entomológicos e biogeográficos visando à vigilância entomológica**. Rio de Janeiro (RJ); 2005. Doutorado [Tese em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Margonari CS, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006; 101(1): 31-38.

Martin AMCB, Rebêlo JMM. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Santa Quitéria, área de cerrado do estado do Maranhão, Brasil. **Iheringia** 2006; 96(3): 283-288.

Martins AVP, Williams P, Falcão AL. **American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)**. Academia Brasileira de Ciências; Rio de Janeiro, Brazil. 1978.

Marzochi KBF, Marzochi MCA, Schubach AO. Leishmaniose visceral: interação hospedeiro-parasito e determinismo das formas clínicas. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32: 59.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **J Bras Med** 1992; 63: 82-104.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. **Rev Soc Bras Med Trop** 1997; 30: 162-164.

_____. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública** 1994; 10: 359-375.

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

Meneses CRV, Azevedo ACR, Costa SM, Costa WA, Rangel EF. Ecology of american cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **J Vector Ecol** 2002; 27(2): 207-214.

Mestre GLC. **Estudo epidemiológico descritivo sobre a expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005.** Cuiabá (MT); 2006. Mestrado [Dissertação em Ciências da Saúde] – Universidade Federal de Mato Grosso.

_____. **Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral (calazar) na área urbana de Várzea Grande, Mato Grosso, 1998-2000.** Cuiabá (MT); 2001. Especialização [Monografia em Saúde Pública] – Universidade Federal de Mato Grosso.

Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40(1): 42-48.

Michalsky EM. **Aspectos entomológicos associados à transmissão de leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais.** Uberaba (MG); 2004. Mestrado [Dissertação em Medicina Tropical e Infectologia]. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* sp. em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2002; 44(5): 255-259.

Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. **J Clin Microbiol** 1997; 35: 2551-2555.

Miranda JC, Reis E, Schrifler A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Neto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(2): 185-188.

Missawa NA. **Fauna flebotomínica, sazonalidade e densidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, Brasil.** XIV Jornada de Iniciação Científica, III Jornada do Programa de Vocação Científica (IC Júnior) e I Jornada de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz. Belo Horizonte (MG); 2006. p. 57.

Missawa NA, Dias ES. **Sazonalidade e densidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, Brasil.** 17º Encontro de Biólogos do CRBio-1. Santos (SP); 2006. p.99.

_____. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em Várzea Grande, estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl 1): 131.

Missawa NA, Lima GBM. **Abundância de *Lutzomyia longipalpis* na área urbana do município de Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso.** 15º Encontro de Biólogos do CRBio-1. São Pedro (SP); 2004. p.75.

_____. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; 39(4): 337-340.

_____. **Levantamento dos vetores das leishmanioses no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no ano de 2004.** 16º Encontro de Biólogos do CRBio-1. Campo Grande (MS); 2005. p.104.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Souza CO, Rangel EF, Michalsky EM, Dias ES. **Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, estado de Mato Grosso.** XXII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. Uberaba(MG); 2006. p. 74.

Molina R, Gradovi L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol** 2003; 97 (suppl 1): S29-S45.

Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38(2): 147-152.

Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994; 27:62-720.

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF, Carneiro MC. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in a urban area of Minas Gerais state. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38(6): 456-463.

Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sandfly at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg** 1993; 49: 68-75.

Moura ST, Fernández CGN, Pandolpho VC, Rodrigues e Silva R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil. **Braz J Vet Res Anim Sci** 1999; 36(2): 123-126.

Muller N, Zimmermann V, Foster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Vet Parasitol** 2003; 114: 223-229.

Nascimento JC, Paiva BR, Malforte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2007; 49(2):119-122.

Neves DP. **Parasitologia humana**. 11ª ed. São Paulo: Edit. Atheneu; 2005. 428p.

Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kiili G, Asiago C. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo District, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Med Vet Entomol** 1992; 6: 385-388.

Nery LCR, Lorosa ES, Franco AMR. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004; 99(6): 571-574.

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

Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espíndola IAC, Dorval MEC, Brazil RP. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006; 101(8): 869-874.

Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. **Cad Saúde Pública** 2001; 17: 1231-1239.

Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas FS, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar PHP, Melo SMB, Franke CR. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciênc Anim Bras** 2005; 6(1): 41-47.

Oliveira PA, Poli E, Costa MR, Pereira HVM, Chaves CEV, Rossi MAS. Associação de lupus eritematoso sistêmico com leishmaniose visceral em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Relato de caso. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 113.

Oliveira SS, Araújo TM. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Cad Saúde Pública** 2003; **19**(6): 1681-1690.

Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; **39**(6): 540-543.

Owusu-Daaku K, Wood RJ, Butler RD. Selected lines of *Aedes aegypti* with persistently distorted sex ratios. **Heredity** 1997; **79**: 388-393.

Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafrente RS, Andrade Jr HF. Single step Polymerase Chain Reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2004; **46**(6): 335-338.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Júnior HF, Malafrente RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia de polimerase. **Cad Saúde Pública** 2007; **23**(1): 87-94.

Paiva-Cavalcanti M, Brito MEF, Gomes YM, Abath FGC. Desenvolvimento e avaliação de PCR em Tempo Real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania chagasi*. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 113.

Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Barbosa AR, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 2001; **65**: 510-517.

Passos-Dias FO, Lorosa EL, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad Saúde Pública** 2003; **19**(5): 1373-1380.

Passos V, Falcão AL, Marzochi MCA, Coutinho CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a

periurban area of metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1993; **88**: 103-110.

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

Piaia II. **Geografia de Mato Grosso. A urbanização do Estado**. 3ª ed. Cuiabá (MT): Edunic; 2003. 64p.

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

Pinheiro NA, Moura RP, Monteiro E, Villa LL. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. **Braz J Med Biol Res** 1999; **32**(1): 55-58.

Quaresma PF. **Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina e quantificação da carga parasitária através da reação em cadeia da polimerase**. XIV Jornada de Iniciação Científica, III Jornada do Programa de Vocação Científica (IC Júnior) e I Jornada de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz. Belo Horizonte (MG); 2006. p.59.

Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of the phlebotominae sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Med Vet Entomol** 1992; **6**: 195-200.

Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann Trop Med Parasitol** 2003; **97** (suppl 1): S17-S28.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci (sic) of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1990; **85**: 39-45.

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

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

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

Rey L. **Parasitologia**. 3ª ed. Edit. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 856p.

Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AA. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **J Pediatr** 2005; 81: 73-78.

Rezende HR, Virgens TM, Oliveira AB, Bergamin FL. Estratificação vertical da fauna flebotômica na região serrana do estado do Espírito Santo, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 111.

Ribeiro ALM, Missawa NA. Spatial distribution of phlebotomine species in the state of Mato Grosso, Brazil, in the period of 1996 to 2001. **Entomol Vect** 2002; 9: 33-34.

Ribeiro ALM, Missawa NA, Zeilhofer P. Distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of medical importance in Mato Grosso State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2007; 49(5): 317-321.

Ribeiro ALM, Rodrigues JSV, Biancardi CMAB. **Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera-Psychodidae) na região metropolitana de Várzea Grande-Mato Grosso**. XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia. Cuiabá (MT); 2000. p.327.

Ribeiro ALM, Oliveira RC, Miyazaki RD, Pignat WA. Inventário dos vetores da Leishmaniose (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em Área de Aproveitamento Múltiplo de Manso, Chapada dos Guimarães, Nobres, Rosário Oeste e Nova Brasilândia/Mato Grosso/Brasil (Dados preliminares). **Rev Soc Bras Med Trop** 2002; 35(1): 313.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol** 1990; 71: 267-375.

Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1999; 93(1): 47-49.

Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **J Clin Microbiol** 1994; 32: 2246-2252.

Rosenthal E, Marty P, Guidice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, Fichoux Y, Cassuto JP. HIV/AIDS Brief reports. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical loations of *Leishmania*. **Clin Inf Dis** 2000; **31**: 1093-1095.

Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol** 1989; **69**: 100-103.

Sacks DL, Silva RP. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **J Immunol** 1987; **139**: 3099-3106.

Sampaio SMP, Andrighetti MTM, Casanova C, costa AIP, Macoris MLG. Estudo da sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em dois municípios da área de transmissão da leishmaniose visceral na região oeste do estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 114.

Sanchez-Tejeda G, Rodrigues N, Parra CI, Hernandez-Montes O, Barker DC, Monroy-Ostria A. Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, state of México. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; **96**: 15-19.

Santalucia M, Martins F, Bezerra WA, Ramos OS, Borges MSL, Ribeiro JB, Cirino BA, Gomes GB. Nota preliminar da entomofauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) no Parque Estadual de Terra Ronca, São Domingos, Goiás. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 137.

Santiago MEB, Lima VMF. *Didelphis* sp. é um reservatório importante de *Leishmania* sp. no município de Bauru (São Paulo – Brasil). **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; **40** (suppl I): 128.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RU, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med Vet Entomol** 1998; **12**: 315-7.

Scorza JV. The phototactict rhythms of some sandflies from Venezuela (Diptera: Phlebotomine). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1972; **14**: 147-153.

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

Sherlock IA, Almeida SP. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. V. Resultados de medidas profiláticas. **Rev Bras Malar D Trop** 1970; 22: 175-182.

Sherlock IA, Miranda JC. Is vector na reservoir control possible for visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop** 1992; 25: 84.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi-Jr G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984, 79: 511.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiúza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; 96(3): 285-291.

Silva ACC, Silvia DF, Freitas RA, Silva AC, Castro LM, Franco AMR. Infecção natural e idade fisiológica de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de mata de terra firme da região nordeste de Manacapuru, AM. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005a; 38(1): 43.

Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad Saúde Pública** 2005b; 21(1): 324-328.

Silva J, Mendonça I, Teixeira T, Silva M, Costa C. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* com *Leishmania chagasi* em área urbana de Teresina, PI. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005c; 38(1): 85.

Silva KCF, Souza AAA, Silva MGS, Lima JAN, Barata IR, Silveira FT, Ishikawa EAT. Detecção de infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* pela reação em cadeia de polimerase (PCR) em *Lutzomyia longipalpis* de área endêmica de calazar no município de Barcarena, Pará. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005d; 38(1): 399.

Silva OS, Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94: 579-582.

Smyth AJ, Grosh A, Hassan Md Q, Basu D, De Bruijn MHL, Adhya S, Mallik KK, Barker DC. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kalazar patients. **Parasitol** 1992; 105: 183-192.

Soares RPP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, Pimenta PFP, Turco SJ. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mol Biochem Parasitol** 2002; 212: 213-224.

Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. **An Acad Bras Cienc** 2003; 75(3): 303-330.

Sousa AQ, Caranha L, Esmeraldo AT, Santos AP, Magalhães RF, Matos FD. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de transmissão de leishmaniose visceral americana nos municípios pertencentes a 21ª célula regional de saúde – Ceres, sul do estado do Ceará, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007a; 40 (suppl I): 123.

Sousa AQ, Caranha L, Santos AP, Sobrinho PH, Filho JF, Gomes RGA, Alves CS. Sazonalidade e densidade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Iguatu, região centro sul, estado do Ceará, Brasil. Dados preliminares. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007b; 40 (suppl I): 123.

Sousa AQ, Caranha L, Sousa AL, Santos FIG, Junior JSN, Sobreira JM, Esmeraldo AT, Santos AP. Levantamento de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Tauá, sertão do Inhamuns, Ceará, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007c; 40 (suppl I): 123.

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

Souza AAA, Silveira FT, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN, Pinheiro MS, Bensabath G, Vasconcelos LS, Silva FM, Ishikawa EAY, Campos MB. Estudos da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na área de influência do Projeto Salobo da Serra do Carajás, estado do Pará, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007a; 40 (suppl I): 109.

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

Souza GF, Biscione FM, Rotondo-Silva A, Greco DB, Rabello ALT. Aspectos clínicos e diagnósticos da co-infecção *Leishmania*/HIV: Estudo de 27 casos. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007b; 40 (suppl I): 122.

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

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(3): 759-765.

Sudia WA, Chamberlain RW. Battery-Operated light trap: an improved model. **Mosquitoes News** 1962; 22: 126-129.

Tauil PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006; 39(3): 275-277.

Tempelis CH. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. **J Med Entomol** 1975; 11: 635-653.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Kühl JB, Alberton D. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. **Cad Saúde Pública** 2003; 19: 1801-1813.

Tesh RB. Control of zoonotic leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg** 1995; 52: 287-292.

Tolezano JE, Taniguchi HH, Hiramoto RM, Mesquita RT, Teixeira D, Aureliano DP, Tolezano LFC. *El Niño Southern Oscillation* (ENSO) e a leishmaniose visceral no Brasil, 1990-2004. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 132.

Tonello VM, Missawa NA, Duarte JLS, Ramos TPB. **Situação da leishmaniose visceral americana em Mato Grosso**. 16º Encontro de Biólogos do CRBio-1. Campo Grande (MS); 2005. p.105.

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

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

Travi BL, Velez ID, Brutus L, Segura I, Jamarillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in Colombian foci in the Pacific coast region. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1990; 84: 676-677.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiological characteristics of american cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the state of Bahia. III. Phlebotomine fauna. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81: 293-301.

Viana FS, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco RS. *Rattus rattus* e *Galea spixii* naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia)* procedentes de área endêmica de leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40 (suppl I): 126.

Viana GMC, Lewi DS, Olzon P, Freire CM, Morelli VM, Vas LH, Felizardo M. Leishmaniose visceral e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA): relato de um caso. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1994; 36(4): 385-387.

Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev Soc Bras Med Trop** 1998; 31 (suppl 2): 85-92.

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

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

WHO. World Health Organization. **Leishmania/HIV co-infection**. South-western Europe 1990-1998. Document WHO/LEISH/2000. 42, Geneve, WHO; 2000.

_____. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Switzerland; 2003 [Capturado 20 set. 2006]. Disponível em <http://www.who.int>.

_____. World Health Organization. **Lucha contra las leishmaniasis**. Série Informe Técnico 793; 1990. 177p.

Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S. *Leishmania*/HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. **Parasitol Today** 1999; 15: 182-186.

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

Young DG, Duncan MA. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Associated Publishers American Entomological Institute. Florida/ USA. 881p; 1994. 881p.

Zeledon R, Murrillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79: 455-459.

Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperatura in development of *Leishmania* parasites. **An Rev Microbiol** 1994; 48: 449-470.

Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri M, Reyes O, Rodrigues V, Centeno M, Barrios RM, Ulrich M. Epidemiologic aspects of american visceral leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61: 945-950.