

**ANA RACHEL OLIVEIRA DE ANDRADE**

**FAUNA FLEBOTOMÍNEA E LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA EM  
PONTA PORÃ, MATO GROSSO DO SUL, LINHA DE FRONTEIRA BRASIL-  
PARAGUAI**

**CAMPO GRANDE  
2012**

**ANA RACHEL OLIVEIRA DE ANDRADE**

**FAUNA FLEBOTOMÍNEA E LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA EM  
PONTA PORÃ, MATO GROSSO DO SUL, LINHA DE FRONTEIRA BRASIL-  
PARAGUAI**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta”, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Professor Doutor Renato Andreotti.

**CAMPO GRANDE  
2012**

Dedico este trabalho à minha família (Arquimedes, Sônia, Ana Thaís, Jairo e Vinícius) pelo apoio em todas as etapas da minha vida e a meu marido Baldomero fonte inesgotável de amor e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu condições de percorrer esta jornada, estando Ele ao meu lado em todos os momentos;

A minha mãe, amiga e conselheira Sonia Andrade, que me deu apoio emocional contínuo, tendo paciência e, principalmente, demonstrando todo seu amor;

Ao meu marido Baldomero, amigo e parceiro de todas as horas, por ter acreditado em meu trabalho, sem ele não seria possível a conclusão dessa etapa;

Ao meu pai Arquimedes, minha irmã Ana Thaís e meu cunhado Jairo, pela paciência nas vezes em que estive ausente;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Andreotti, pelas conversas constantes, pelas novas idéias sugeridas, pelos cafés em momentos de tensão e pelo apoio oferecido durante o desenvolvimento do trabalho;

As professoras do laboratório de parasitologia humana da UFMS por terem oferecido toda estrutura suficiente para o desenvolvimento das etapas do trabalho. À Maria Elizabeth Dorval por ter supervisionado o estágio realizado em 2005 e pelo acompanhamento durante todo o período em que ocorreram as capturas, e à Alessandra Gutierrez pelo auxílio na revisão do manuscrito e pela ajuda na identificação dos exemplares;

A equipe técnica do laboratório de parasitologia humana da UFMS, Dona Zélia, Jú e em especial à Geucira pelo apoio nas viagens e durante as capturas, além do auxílio no processo de identificação dos insetos;

A Elisa Oshiro pelo apoio e amizade oferecida durante o período em que estive no laboratório desde 2005, quando as portas para estágio foram abertas para mim;

A Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul e à Secretaria Municipal de Saúde de Ponta Porã, pela ajuda referente ao deslocamento, hospedagem e alimentação no período em que o trabalho estava sendo desenvolvido;

Ao motorista João Anastácio pela disposição em nos acompanhar nas viagens e pelo auxílio durante o período em que ocorreram as capturas;

A equipe do laboratório de Biologia Molecular da UFMS, em especial ao Manoel, Andressa e Maiara, pela disposição em ensinar cada etapa, pelo acompanhamento constante, pela paciência e pela conversa amigável durante o período em que estive no laboratório;

Ao Médico Veterinário Paulo Mira, pelas informações oferecidas e por atender as minhas dúvidas sempre que necessário;

Ao Prof. Dr. Antonio Paranhos (Toni) e ao Alisson, pela ajuda no desenvolvimento da etapa relacionada ao georreferenciamento;

A equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Ponta Porã, em especial aos veterinários Raquel Bortolini e Alisson Marques, por terem aberto as portas e auxiliado diretamente nas coletas durante o período em que o estudo foi realizado;

A professora Eunice Galati pela revisão dos artigos e pelo auxílio “virtual” em diversas etapas desse trabalho;

Aos amigos queridos, em especial Carla Cardozo, Cyntia Moreira, Bárbara Lima, Larissa Fabris, Mirella Santos, Silvana Kato e Renato Nacer, pelas distrações durante os momentos de tensão e por todo o carinho oferecido sempre que necessário;

Ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS e a CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

À querida Néia e Terenilce pela disposição em me atender sempre que necessário;

Ao Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, coordenador do programa no período da minha admissão e Profa. Dra. Inês Tozetti, coordenadora atual, pelo profissionalismo e atendimento durante os anos de desenvolvimento do projeto;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento e execução deste trabalho.

Tudo posso Naquele que me fortalece. Filipenses 4:13

Bíblia... (2009)

## RESUMO

O estado de Mato Grosso do Sul vem passando por um processo de urbanização que acarreta em perda de áreas com vegetação nativa. A retirada de cobertura vegetal aproxima vetores de agentes etiológicos do homem e de animais domésticos ocasionando modificações na epidemiologia de doenças como a Leishmaniose Visceral Americana. Ponta Porã é um município do estado que se caracteriza por fazer fronteira seca com o Paraguai e desde 2007 vem relatando casos da parasitose na população. O objetivo do presente estudo foi avaliar a fauna flebotomínea e os aspectos ambientais relacionados à transmissão da LVA em Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2009 e 2010. Foram realizadas coletas quinzenais com armadilha automática luminosa modificada modelo CDC em sete áreas da cidade (contendo dois ecótipos: intradomicílio e peridomicílio) e coletas mensais com armadilha de Shannon em área central da cidade. Foi verificada a infecção natural das fêmeas coletadas através do método de dissecação e, posteriormente, da reação em cadeia da polimerase (PCR). A cobertura vegetal da área urbana da cidade foi avaliada através dos seguintes índices: vegetação por diferença normalizada (NDVI), índice de vegetação de ajuste do solo (SAVI) e índice de umidade por diferença normalizada (NDWI). Os resultados mostraram que a fauna flebotomínea da cidade é composta por oito espécies, com destaque para *Nyssomyia whitmani*, espécie vetora da *Leishmania braziliensis* no estado, e para *Lutzomyia longipalpis*, espécie vetora da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Houve a predominância de machos em ambas armadilhas. Os insetos foram capturados em maior quantidade (61,5%) no intradomicílio e dentre as espécies coletadas, *Lu. longipalpis* foi a mais frequente (97,03%) e mais abundante estando presente durante todo o ano, com picos após os períodos chuvosos e demonstrando correlação positiva com a temperatura. Foi coletada em área central da cidade, através da armadilha de Shannon, uma fêmea da espécie *Evandromyia cortelezii* naturalmente infectada com *L. (L.) infantum chagasi*. Não foi observada correlação positiva entre o número de flebotomíneos capturados com o número de casos humanos e caninos de leishmaniose, mas a concentração dos casos e de vetores em área central da cidade é motivo de alerta para manutenção do ciclo epidemiológico. A análise da cobertura vegetal e a correlação do NDVI, SAVI e NDWI com os flebotomíneos coletados, demonstrou ausência de correlação, sendo possível encontrar vetores em elevada quantidade tanto em áreas de mata quanto em ambientes antropizados. O encontro de *Lu. longipalpis* em regiões com pouca vegetação e umidade sugere a adaptação da espécie, demonstrando sua estreita associação ao homem e aos ambientes que ele habita. A característica turística de Ponta Porã reforça a necessidade de sua importância epidemiológica por ser município vulnerável e de transmissão esporádica de LVA; e sua localização geográfica, limítrofe com o Paraguai através de fronteira seca, torna possível a existência de corredor de entrada e saída de vetores e cães infectados entre os dois países.

Palavras-chave: área de fronteira, flebotomos, infecção natural, geotecnologias.

## ABSTRACT

The state of Mato Grosso do Sul has been going through an urbanization process that causes losses of native vegetation areas. The removal of vegetation cover makes closer the vectors of etiologic agents of man and domestic animals, thus causing changes in the epidemiology of diseases such as American Visceral Leishmaniasis (AVL). Ponta Porã is a county located at the dry border with Paraguay and since 2007 has reported cases of parasitosis in the population. The aim of this study was to evaluate the phlebotomine fauna and the environmental aspects related to the transmission of AVL in Ponta Pora, Mato Grosso do Sul in 2009 and 2010. Fortnight collections have been made with CDC automatic modified light traps in seven areas of the city (containing two ecotypes: indoors and outdoors). Monthly collections have also been made with Shannon traps in the central area. The dissection method and then the polymerase chain reaction (PCR) have been used to detect natural infection in the females collected. The vegetation cover in the urban area was assessed using the indices: the *Normalized Difference Vegetation Index* (NDVI), *Soil Adjusted Vegetation Index* (SAVI) and the *Normalized Difference Water Index* (NDWI). The results showed that the phlebotomine fauna of the city is composed of eight species, especially *Nyssomyia whitmani*, vector species of *Leishmania braziliensis* in MS, and *Lutzomyia longipalpis*, vector species of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. The predominance of males over females was observed through the two traps. The insects were captured in greater quantity (61.5%) indoors and among the species collected, *Lu. longipalpis* was the most frequent (97.03%), the most abundant and could be found throughout the year, peaking after the rainy periods demonstrating a positive correlation with temperature. One female of *Evandromyia cortelezzii* naturally infected with *L. (L.) infantum chagasi* was collected in the central area by the Shannon traps. There was no positive correlation between the number of phlebotomines captured with the number of cases of canine and human leishmaniasis, but the concentration of cases and vectors in the central city area is a matter of warning for maintenance of epidemiological cycle. A analysis of vegetation and the correlation of NDVI, SAVI and NDWI with phlebotomines collected showed no correlation, and vectors can be found in high amounts in forest and disturbed environments. The finding of *Lu. longipalpis* in regions with little vegetation and humidity suggests that the species has suffered in the region, demonstrating its close association with man and the environment it inhabits. The tourist feature of Ponta Porã reinforces its epidemiological importance as it is a vulnerable city and transmission sporadic for AVL. The geographical location, bordering Paraguay through dry border, makes possible the existence of a corridor of vectors and infected dogs between the two countries.

Key words: border area, phlebotomus, natural infection, geotechnology

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 Leishmanioses</b> .....	12
2.1.1 <u>Aspectos gerais</u> .....	12
2.1.2 <u>Leishmanioses no Brasil</u> .....	15
2.1.3 <u>Leishmanioses em Mato Grosso do Sul</u> .....	18
<b>2.2 Flebotomíneos</b> .....	19
<b>2.3 Reservatórios da doença</b> .....	24
<b>2.4 Infecção natural por flagelados nos vetores e técnicas moleculares</b> ...	25
<b>2.5 Dados ambientais espaciais</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	30
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>4.1 Tipo e período da pesquisa</b> .....	31
<b>4.2 Área de estudo</b> .....	31
<b>4.3 Coleta de Flebotomíneos</b> .....	33
<b>4.4 Método para análise dos dados</b> .....	40
4.4.1 <u>Fauna flebotomínea</u> .....	40
4.4.1.1 Infecção natural e verificação de espécies .....	40
4.4.1.2 Índice de abundância das espécies padronizado .....	40
4.4.1.3 Média Geométrica de Williams .....	41
4.4.1.4 Índice de Shannon (H) .....	42
4.4.1.5 Índice de Pielou (J) .....	42
4.4.1.6 Frequência relativa .....	43
4.4.2 <u>Análise molecular</u> .....	43
4.4.2.1 Taxa mínima de infecção .....	43
4.4.2.2 Extração do DNA de <i>Leishmania</i> .....	43
4.4.2.3 Reação em cadeia da polimerase .....	43
4.4.2.4 Eletroforese em gel de agarose .....	44
4.4.2.5 Reação em cadeia da polimerase para região ITS-1 .....	45

4.4.2.6 Purificação com o produto de PCR .....	45
4.4.2.7 Sequenciamento .....	45
4.4.2.8 Alinhamento .....	45
4.4.3 <u>Casos humanos e caninos</u> .....	45
<b>4.5 Dados climáticos</b> .....	46
<b>4.6 Análises estatísticas</b> .....	46
<b>4.7 Dados espaciais ambientais</b> .....	46
<b>4.8 Aspectos éticos</b> .....	48
<b>5 RESULTADOS</b> .....	49
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
<b>ANEXO A- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FLEBOTOMINEOS</b> .	105
<b>ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	106

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, alterações ambientais atuam diretamente na distribuição e reemergência das doenças tropicais, com aproximação de hospedeiros, vetores e parasitas modificando o nível de endemicidade das doenças infecciosas. A leishmaniose visceral (LV) enquadra-se nessa realidade, pois atualmente vem se expandindo em âmbito mundial.

No Brasil, o aumento de casos humanos de LV em todas as regiões, reforça o fato de a mesma ser considerada um problema de saúde pública devido a elevada incidência e letalidade que vem apresentando.

Os flebotomíneos são os principais vetores dos agentes que ocasionam a doença, podendo se apresentar sob duas formas clínicas no Brasil: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA). A LVA tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e como principal vetor, o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

O conhecimento da fauna flebotomínea em área de transmissão de leishmanioses mostra-se de grande importância para o estabelecimento de medidas preventivas cada vez mais eficazes e de controle dessas protozooses. A utilização de técnicas de diagnóstico e análise, como a biologia molecular e de ferramentas como as geotecnologias auxiliam o processo de investigação epidemiológica de uma determinada doença.

O Estado de Mato Grosso do Sul vem apresentando alto índice de infecção por *Leishmania* em humanos e em cães, além do elevado número de vetores das mesmas. O crescimento no número de indivíduos infectados e de cães infectados leva ao desenvolvimento de estudos nas diversas regiões do estado com o intuito de se conhecer o padrão epidemiológico que a doença vem apresentando.

Em 2007, houve a confirmação do primeiro caso de leishmaniose visceral humana em Ponta Porã, região localizada na fronteira entre Brasil e Paraguai. A presença constante e abundante de vetores tornou-se motivo de alerta para a possibilidade de surtos da doença, incluindo a cidade no grupo de municípios vulneráveis e de transmissão esporádica. Neste sentido, a determinação da distribuição espacial e da taxa de infecção natural de flebotomíneos, além da análise ambiental da área urbana de Ponta Porã, possibilitou uma importante contribuição para ampliar os conhecimentos

sobre a epidemiologia desta zoonose na região, colaborando assim, para a definição de melhores estratégias de controle.

Por tratar-se de fronteira seca com outro país e considerando que o estudo a respeito da dinâmica da LVA no município de Ponta Porã subsidiará as ações pertinentes à vigilância e ao controle do agravo no município, justificou-se o desenvolvimento da presente pesquisa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

#### 2.1.1 Aspectos gerais

Fatores como migração e urbanização promovem o aumento e concentração de variadas doenças em diferentes localidades. Essa aproximação favorece o aumento crescente de enfermidades como as leishmanioses, que acometem o ser humano e diferentes tipos de animais silvestres e domésticos (AZEVEDO *et al.*, 2011; MACMORRIS-ADIX, 2009; NERY-COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007).

Rápidas mudanças nas condições ambientais em diversas regiões tropicais causadas pela destruição do habitat associadas aos processos de desmatamento têm grande influência na população vetorial e, por conseguinte na transmissão da doença (COSTA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Diversos grupos de pesquisa têm contribuído com estudos sobre vetores e hospedeiros envolvidos nos ciclos enzoótico e zoonótico das leishmanioses, com hipóteses que investigam e comprovam o papel dos diferentes vetores como transmissores e de animais domésticos e silvestres como reservatórios de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (LAINSON, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, na última década, regiões endêmicas vêm se expandindo, concomitantemente com o aumento no número de casos registrados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

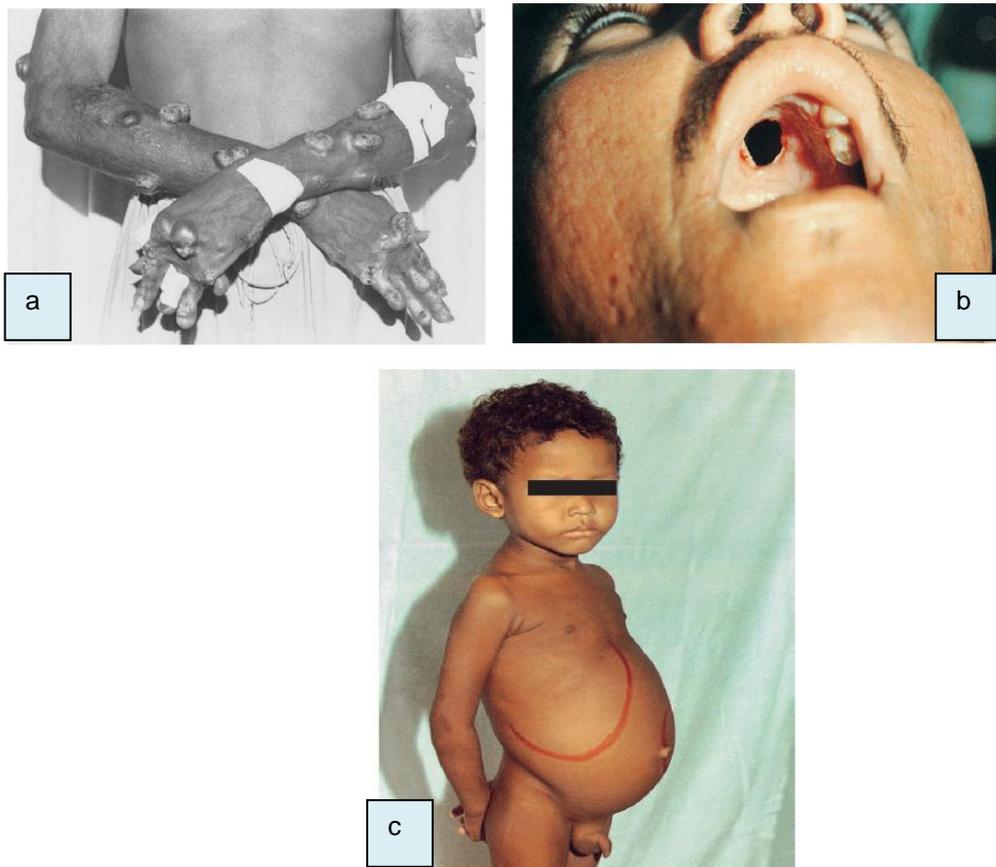
Ao longo dos anos, estudos a respeito da fauna flebotomínea, têm sido desenvolvidos em países que fazem fronteira com o estado de Mato Grosso do Sul, com destaque para aqueles realizados na Bolívia e Paraguai (BRAZIL; CABALLERO; HAMILTON, 2009; LE PONT; DESJEUX, 1987; PAIVA *et al.*, 2007).

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos em todo o mundo. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de parasita envolvido e da relação do mesmo com seu hospedeiro, apresentando amplo espectro epidemiológico e ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo (CHAPPUIS *et al.*, 2007; LAINSON, 2010; SHAW, 2007).

A leishmaniose pode apresentar-se como zoonose, antroponose ou antroponose, estas duas últimas, quando o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (GONTIJO; CARVALHO, 2003; LAINSON; SHAW, 2005). No Brasil é considerada uma zoonose onde todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (MONTEIRO *et al.*, 2005).

No ser humano, as leishmanioses apresentam-se sob duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT), que pode determinar manifestações cutâneas, cutâneo-mucosas ou cutâneo-difusa-anérgicas e Leishmaniose Visceral (LV), que determina a forma visceral (Figura 1) (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Figura 1 - Indivíduos do estado do Pará, Brasil, apresentando sinais característicos de LT devido infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* (a), *Leishmania (V.) braziliensis* (b) e sinais de LV ocasionados pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* (c)



Fonte: Lainson e Shaw (2005).

No contexto da saúde pública, a LT tem aumentado significativamente sua importância devido ao crescente processo de urbanização. Inicialmente, a doença tinha caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (DIAS *et al.*, 2007; RANGEL; LAINSON, 2009).

Em franca expansão no Brasil e sendo ocasionada por diferentes espécies de *Leishmania*, é considerada uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar (BRASIL, 2007; LAINSON, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) é causada por um protozoário do complexo *Leishmania donovani*: *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1902) (Ross, 1903) (Velho Mundo); *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) (Velho Mundo); *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) (Novo Mundo) com diferente distribuição geográfica no mundo. No Brasil, de acordo com estudos sobre a nomenclatura da espécie o agente responsável pela LV é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (DANTAS-TORRES, 2006a; LAINSON, 2010; LEBLOIS *et al.*, 2011, SEGATTO *et al.*, 2012).

A referida doença é espectral, cuja apresentação clínica varia de formas assintomáticas até o quadro clássico da parasitose. O protozoário provoca uma doença crônica e sistêmica com intenso parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear. Baço, fígado e medula óssea são particularmente acometidos e a forma clássica da doença é descrita pela tríade: febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (BADARÓ; DUARTE, 1996).

Outras manifestações clínicas desenvolvem-se com a progressão da doença, em especial a diarreia, icterícia, vômito e o edema periférico que dificultam o diagnóstico diferencial com outras patologias, retardando sua identificação (OLIVEIRA, J. M. *et al.*, 2010).

Cerca de 90% dos casos são fatais se a pessoa não receber tratamento adequado e normalmente hemorragias e infecção generalizada são as causas da morte pela doença (BRASIL, 2006; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Deve-se considerar, contudo, que tanto o surgimento da doença quanto sua evolução são consequências das interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA *et al.*, 2006).

Um grande risco relacionado ao aumento da distribuição da LV é à suscetibilidade dos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Essa co-infecção pode ser fatal, devido ao fato de ambas as enfermidades impactarem sobremaneira o sistema imunológico do indivíduo portador. Atualmente a LV vem assumindo caráter de doença

oportunista em pessoas infectadas com o HIV e a concomitância de ambas as infecções pode reduzir a sobrevivência dos pacientes (MACMORRIS-ADIX, 2009; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Diversos fatores podem ser citados como contribuintes para a expansão e aumento do número de casos da LV, em especial os fortes e decisivos componentes do potencial de transmissão advindos da ligação com o vetor, além da vulnerabilidade dos indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento da doença (COSTA, 2011).

Com ampla distribuição mundial, estima-se que a maioria dos casos da doença esteja ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Nepal (LAINSON, 2010; QUINNELL; COURTENAY, 2009; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Na América Latina, estende-se desde o México até a Argentina, sendo que o Brasil concentra a maior parte dos casos humanos registrados no Novo Mundo (LAINSON; RANGEL, 2005; LYNN *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2010; SALÓMON; QUINTANA; ZAINDENBERG, 2008).

### 2.1.2 Leishmanioses no Brasil

No Brasil, as leishmanioses manifestam-se basicamente de duas maneiras: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) cuja etiologia se atribui a diversas espécies de *Leishmania* (LAINSON 2010; LAINSON; SHAW, 2005).

A LVA parece ser tão antiga quanto a LTA na América Latina, porém há menor quantidade de evidências visuais externas de sua existência. Entretanto, a enfermidade conhecida como *barriga d'água*, associada à dilatação abdominal, febre e mal estar era bastante conhecida e boa parte de suas ocorrências foram provavelmente casos de LVA não diagnosticados (LAINSON, 2010).

Estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses incluindo a análise entomológica vêm sendo desenvolvidos há alguns anos em países vizinhos o que é de extrema importância pelo fato de alguns países dentre eles o Paraguai fazerem fronteira com estados brasileiros (BRAZIL; CABALLERO; HAMILTON, 2009; NASCIMENTO *et al.*; 2007; ROSA *et al.*, 2010; TEDESQUI *et al.*, 2012).

O primeiro relato de LVA nas Américas foi provavelmente o de Migone em 1913. Ele observou o que considerou serem formas amastigotas no sangue de um paciente no Paraguai. Os sintomas reportados eram altamente indicativos de LVA, tendo o paciente

evoluindo ao óbito após o tratamento. Antes de adoecer, o paciente havia trabalhado na construção da ferrovia São Paulo-Corumbá, no Brasil, onde, acredita-se, teria sido infectado (LAINSON, 2010).

A LVA foi reconhecida no Brasil em razão das pesquisas feitas por Evandro Chagas e equipe na segunda metade da década de 1930 que assinalaram a doença como nova entidade mórbida do homem da América do Sul e por Deane em 1956 que a descreveu como endêmica no Ceará (LAINSON, 2010).

Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica em sua distribuição geográfica. A doença antes restrita a áreas rurais do Nordeste avançou por outras localidades alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos (BOTELHO; NATAL, 2009; DANTAS-TORRES, 2006b; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; GONTIJO; MELO, 2004; MIRANDA, 2008; PINTO *et al.*, 2010; XIMENES *et al.*, 2007).

Com milhares de casos notificados anualmente, a LVA vem se expandindo de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, sendo assinalada em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, inclusive na região sul, com casos recentemente confirmados (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010; COSTA, 2011; SOUZA; SANTOS; ANDRADE-FILHO, 2009).

O padrão de transmissão da doença vem se alterando ao longo dos anos, devido às modificações ambientais que alteraram a ecologia de alguns flebotomíneos e, conseqüentemente, à sua adaptação. Um novo perfil de transmissão pode ser observado, onde os seres humanos fazem parte ativamente da cadeia epidemiológica (BEJARANO *et al.*, 2002; MARZOCHI; MARZOCHI, 1997; RANGEL; VILELA, 2008).

A LVA é uma doença de grande relevância na saúde coletiva devido à sua heterogeneidade epidemiológica, alta letalidade em pacientes não tratados, e elevada soroprevalência (NERY-COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007). Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2011 foram confirmados 3.593 casos de LVA humana, no país (MATO GROSSO DO SUL, 2012).

Como principais determinantes dos níveis endêmicos atuais da LVA, atribuem-se alguns fatores interrelacionados. Salienta-se a existência de práticas agrárias, exploração do solo, interrupção da vigilância epidemiológica, processo de urbanização, áreas sem condição de moradia adequada e conseqüentemente a presença de cães infectados, propiciando a adaptação da *Leishmania* ao novo nicho ecológico (LAINSON; RANGEL, 2005; MACMORRIS-ADIX, 2009; RANGEL *et al.*, 2012).

A LTA encontra-se entre as seis doenças infectoparasitárias de maior importância no Brasil, com ocorrência em todas as regiões, constituindo-se, portanto, em uma das afecções dermatológicas que merece grande atenção (BRASIL, 2007; SARAIVA *et al.*, 2006).

Pode ocorrer em surtos epidêmicos ligados à derrubada das matas, à exploração desordenada da floresta e às atividades humanas ligadas à agricultura. Dentro desse contexto, as formas de interação do homem com o meio ambiente são elementos importantes para a aquisição da infecção, que ocorre quando os humanos são picados por fêmeas de flebotomíneos infectadas, que transmitem o parasito no momento do repasto sanguíneo (GAMA-NETO *et al.*, 2010).

A doença possui evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilagosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa podendo ocasionar lesões destrutivas e desfigurantes, com grande repercussão psicossocial (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Esta doença persiste endemicamente em áreas de colonização antiga, mas parece que ainda mantém interdependência com as matas remanescentes modificadas (LONARDONI *et al.*, 2006).

No Brasil existem sete espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas dermatópicas humanas: *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), *L. (V.) guyanensis* (Floch, 1954), *L. (V.) lainsoni* (Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987), *L. (V.) shawi* (1989), *L. (V.) naiffi* (Lainson & Shaw, 1989); *L. (V.) lindenbergi* (Silveira, Ishikawa, De Souza & Lainson, 2002) e *L. (Leishmania) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972) (SILVEIRA *et al.*, 2002).

A *L. (V.) braziliensis* (Vianna, 1911) é o agente etiológico da entidade nosológica conhecida no homem por leishmaniose cutânea (LC). Esta é a responsável pela leishmaniose cutâneomucosa (LCM) ou espúndia, forma clínica muito importante em decorrência das dificuldades de diagnóstico e tratamento, assim como, pelas destruições e mutilações que determina (LAINSON, 2010).

Esta espécie de *Leishmania* possui maior distribuição geográfica, representando importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas. Os aspectos envolvidos em seu ciclo de transmissão ainda não estão totalmente esclarecidos, apresentando características diversas conforme a área geográfica, tornando-se um grande desafio para os programas de controle da doença (ANDRADE *et al.*, 2005).

Fora da região amazônica, onde os animais reservatórios são desconhecidos, a *L. (V.) braziliensis*, além do homem, acomete também animais domésticos como cães e eqüinos que poderiam contribuir para a dispersão para outros locais com presença de flebotomíneos transmissores (LAINSON, 2010; LEGRIFON *et al.*, 2012).

A leishmaniose que tem por etiologia a *L. (L.) amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972), manifesta-se por um amplo espectro de formas clínicas. Sua maior importância deve-se ao fato de que indivíduos podem desenvolver a leishmaniose cutâneo-difusa-anérgica (LCDA), caracterizada pelo polimorfismo lesional, compreendendo erupções nodulares ou papulares que envolvem extensas áreas da superfície corporal, de caráter deformante e até o momento, incurável (LAINSON; SHAW, 2005).

### 2.1.3 Leishmanioses em Mato Grosso do Sul

Nos últimos anos, Mato Grosso do Sul (MS) tem sido alvo de crescentes movimentos de grupos ligados a assentamentos de famílias para projetos agropecuários ou ecoturismo. Tais atividades expõem pessoas a ambientes poucos conhecidos, podendo favorecer o contato com certas populações de animais integrantes do quadro epidemiológico de agravos à saúde do homem (ANDRADE *et al.*, 2009; GALATI *et al.*, 2003).

A LVA é uma doença que está presente no Estado de Mato Grosso do Sul há mais de 20 anos e parecia ser um problema restrito aos municípios de Corumbá e Ladário (NUNES, *et al.*, 1988).

A primeira descrição de um caso humano, supostamente autóctone, do Continente Americano de LVA, comprovado parasitologicamente, ocorreu em 1911, em um imigrante italiano que, após viver treze anos em Santos, viajou para a região de Porto Esperança, Mato Grosso (hoje, Mato Grosso do Sul), onde ficou doente (MIGONE, 1913; OLIVEIRA A. L. *et al.*, 2006; REGO *et al.*, 1983).

A partir de 1998, a parasitose começou a expandir-se para regiões próximas a Campo Grande, capital de Mato Grosso do Sul, havendo ocorrência de casos em Miranda, Aquidauana e Anastácio. Atualmente há registros de casos autóctones em 58 Municípios do Estado e a doença encontra-se em franca expansão tanto em área rural quanto urbana (ALMEIDA *et al.*, 2010a; MATO GROSSO DO SUL, 2012).

Entre os anos de 1999 a 2011 foram notificados um total de 2.530 casos de leishmaniose, sendo as cidades de Campo Grande, Corumbá, Aquidauana e Três

Lagoas as com maiores índices de indivíduos portadores da doença. Assim pode-se observar o processo de expansão da mesma e a sua gravidade em termos de saúde pública (BOTELHO; NATAL, 2009; MATO GROSSO DO SUL, 2012; OLIVEIRA, J. M. *et al.*, 2010; OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2000).

A cidade de Três Lagoas teve seu primeiro caso notificado no ano 2000, apresentando um pico em 2009. Hoje é considerada o segundo município de Mato Grosso do Sul com maior incidência de casos autóctones em humanos. Campo Grande, capital do estado, atualmente é a cidade com maior número de casos registrados de LVA e de Leishmaniose canina (CORTADA *et al.*, 2004; MATO GROSSO DO SUL, 2012; OLIVEIRA, A. L. *et al.*, 2006; OLIVEIRA G. M. G. *et al.*, 2010).

Ponta Porã contou com a primeira experiência de monitoramento entomológico conforme dados da Secretaria de Estado de Saúde (MATO GROSSO DO SUL, 2008), entre os anos de 2005 a 2007, por iniciativa do Laboratório Regional de Entomologia de Dourados. Neste levantamento foi detectada a presença de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia whitmani* vetores da LVA e LTA respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2010b). Em consequência do achado, foi realizada investigação sorológica canina para a presença da enzootia, conforme preconizam as orientações do Ministério da Saúde.

Foram encontrados cães sororreagentes, mas todos os casos eram importados de Campo Grande. A eliminação dos mesmos foi feita e os animais não reagentes foram mantidos sob vigilância e acompanhamento.

No ano de 2006 foi notificado em Campo Grande um caso de LVA, sendo que Ponta Porã era município de residência (MATO GROSSO DO SUL, 2012).

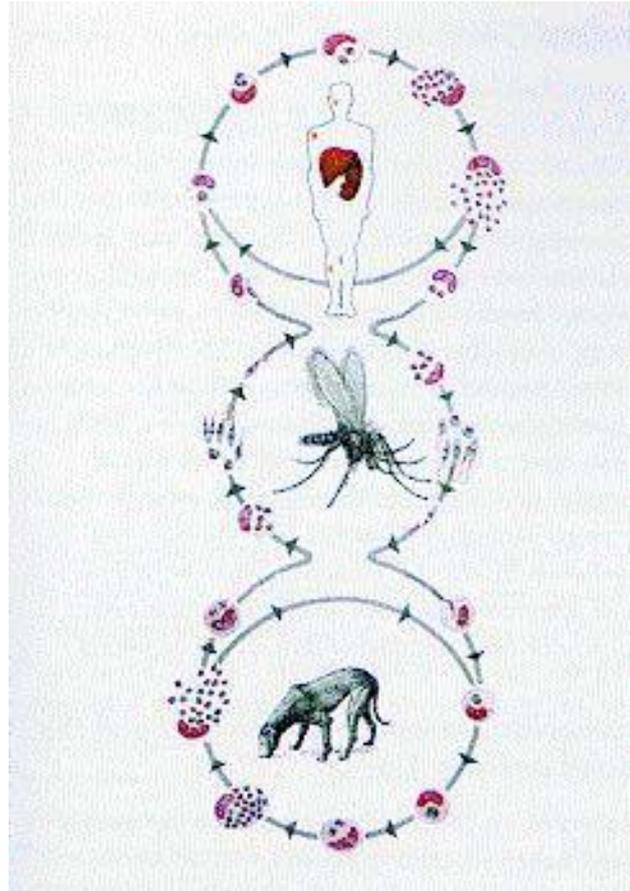
Em 2007, Ponta Porã deixou de ser considerada área silenciosa e se tornou município vulnerável após a confirmação do primeiro caso de LVA. Até o mês de março de 2012 foram confirmados 13 casos da doença, sendo a cidade considerada local de transmissão esporádica da doença.

## 2.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, cujas fêmeas praticam hematofagia e por isso são importantes na transmissão de doenças ao homem e aos animais, como bartoneloses, arboviroses e leishmanioses (AGUIAR; MEDEIROS, 2003).

Nestes, as *Leishmanias* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo, onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, denominadas promastigotas, que são posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (SHERLOCK, 2003) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de transmissão da leishmaniose: interação entre vetor e hospedeiros vertebrados



Fonte: Google imagens (2012).

A picada desses insetos pode também ser responsável pelo aparecimento de reações alérgicas em determinados indivíduos suscetíveis (MAROLI; FERICIANGELI; ARIAS, 1997; SERGENT *et al.*, 1915).

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* é o maior e de mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, um pouco mais de 400 são de *Lutzomyia*. O gênero é formado por 15 subgêneros com 11 grupos de espécies (GALATI *et al.*, 2003; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, ou seja, passam por estágios larvais durante o seu desenvolvimento. Suas larvas desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, enquanto os adultos de ambos os sexos, se alimentam de açúcares de plantas. Os adultos, (machos e fêmeas) precisam de carboidratos como fonte de energia para exercerem suas atividades de vôo, acasalamento e postura. Na natureza as principais fontes de carboidratos são provenientes de seiva vegetal e secreções açucaradas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

É fato que os açúcares têm importante papel no desenvolvimento e infectividade de *Leishmania*, agindo como bacteriostáticos e como fonte de energia para os parasitas que parecem multiplicar-se mais facilmente na presença dessa substância (LAINSON; RANGEL, 2003). O desenvolvimento do ovo ao adulto é de aproximadamente um mês em temperatura média de 25°C. As temperaturas inferiores afetam o desenvolvimento larvário e a atividade do inseto adulto fica diminuída, aumentando o tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto (CASANOVA, 2001).

Somente as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o alimento fundamental para a maturação dos ovos, daí a importância para a transmissão de agentes patógenos (FORATTINI, 1973).

Algumas espécies alimentam-se de sangue apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras podem tomar refeições sangüíneas múltiplas durante um único ciclo de ovoposição, tornando-se vetores mais importantes. Os machos sugam apenas sucos vegetais ou açúcares, o que a fêmea também costuma fazer antes ou após a alimentação sanguínea. Algumas espécies picam exclusivamente determinados tipos de vertebrados, porém outras têm hábitos ecléticos, picando indiferentemente várias espécies de mamíferos (SHERLOCK, 2003).

A atividade hematofágica predominante é a noturna, porém podem exercê-la durante o dia, principalmente em ambientes com pouca luminosidade, como cavernas e áreas florestais (GALATI *et al.*, 1996).

Os tipos de abrigos utilizados pelos flebotomíneos adultos variam de acordo com o microhabitat, estação do ano, umidade relativa do ar e de acordo com a espécie. Pelo seu revestimento delgado, abrigam-se em locais onde possam proteger-se das mudanças bruscas que ocorrem no ambiente. Assim, mantêm-se refugiados em locais com bom teor de umidade, matéria orgânica em decomposição, pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar, ou seja, em locais que os protejam da dessecação (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; FORATTINI, 1973).

A proximidade do homem às áreas florestais e a criação de animais domésticos atraem grande quantidade de espécies de flebotomíneos ao peridomicílio. Ao serem atraídos, estabelecem-se nessas áreas e sua presença pode contribuir para a manutenção do ciclo de transmissão transformando-se em elos entre os animais domésticos e a população (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; MISSAWA *et al.*, 2008, 2011).

Das 240 espécies aproximadas de vetores dos agentes da doença descritas no Brasil, 59 são encontradas em Mato Grosso do Sul, tanto em áreas urbanas quanto rurais (ALMEIDA *et al.*, 2010a; GALATI, 2003), destaca-se a presença de espécies vetoras da LVA e LTA, como *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi*, *Nyssomyia whitmani*, *Bicromomyia flaviscutelatta* e *Micropigomyia migonei* (ALMEIDA *et al.*, 2010a; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A espécie *Lutzomyia longipalpis* principal vetor da *L. (L.) infantum chagasi*, é extremamente eclética quanto ao *habitat*. Embora seja encontrado em matas, associa-se mais estritamente a ambientes rochosos, com vegetação de mata aberta do tipo cerrado e caatinga além de se mostrar adaptado ao ambiente degradado, principalmente em área peridomiciliar (CUTOLO *et al.*, 2008; GALATI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2008).

Apesar de *Lutzomyia longipalpis* ser considerado o principal vetor em toda área de ocorrência da LVA, *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938) tornou-se fortemente suspeita de ser um vetor alternativo no estado após o isolamento de *L. (L.) infantum chagasi* de 14 espécimes (SANTOS *et al.*, 1998; SOUZA-PINTO *et al.*, 2010).

*Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor na transmissão de LVA, em Corumbá e Ladário (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998). Em Jaciara e Pontal do Araguaia, Mato Grosso, a espécie é predominante além de ser considerada responsável pela transmissão da *L. (L.) infantum chagasi* na localidade, após confirmações entomológicas nas duas regiões (AMARAL *et al.*, 2011; MISSAWA *et al.*, 2011).

A espécie *Nyssomyia whitmani* é considerada o principal vetor da *L. braziliensis* nas regiões de caatinga, cerrado, mata atlântica, e em estados como Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (ANDRADE *et al.*, 2009; BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LEGRIFON *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2008; OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, 2010; THOMÉ, 1999).

Em Mato Grosso do Sul, estudos sobre a fauna flebotomínea apontam para a participação da espécie em Porto Murtinho, Bonito, Três Lagoas, Campo Grande e Ponta

Porã (ALMEIDA *et al.*, 2010a; ALMEIDA *et al.*, 2010b; ANDRADE *et al.*, 2009; GALATI *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2008).

*Bicromomyia flaviscutellata* é o vetor mais importante da *L. (L.) amazonensis*, que foi detectada, a princípio, na Bacia Amazônica, sendo a maioria dos casos humanos proveniente de municípios do Maranhão (REBELO *et al.*, 2010). Nos últimos anos, constatou-se que a espécie possui uma distribuição geográfica bem mais ampla fazendo-se, também, presente em outros estados do Nordeste, bem como em regiões do Sudeste, Centro-Oeste e do Sul do Brasil (DORVAL *et al.*, 2006; GRIZARD *et al.*, 2000; SAVANI, 2004; SILVEIRA *et al.* 1990; SOUZA *et al.*, 2005).

De acordo com Dorval *et al.* (2006) a espécie *Bi. flaviscutellata*, pode estar participando do ciclo de transmissão da LTA em Bela Vista (Mato Grosso do Sul), uma vez que o tipo de cobertura vegetal local possui características de mata fechada, com vegetação alta, sendo encontrada, ainda, a presença de reservatórios silvestres, que poderiam estar atuando como possíveis reservatórios do parasita.

Relatos da espécie supracitada também foram descritos em Bonito, área de intenso ecoturismo e na capital do estado, Campo Grande caracterizada por ser uma região altamente urbanizada, mas com corredores de vegetação em diversos pontos da área urbana (ALMEIDA *et al.*, 2010a; ANDRADE *et al.* 2009; NUNES *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2003). Essa espécie era considerada estritamente silvestre, mas vem adaptando-se não só às áreas de vegetação secundária (capoeira), como ao ambiente domiciliar, como já observado em como Campo Grande e na Ilha de São Luís (OLIVEIRA *et al.*, 2003; RÊBELO *et al.*, 2010).

*Evandromyia cortelezzii* é uma espécie que tem sua capacidade vetorial estudada por diversos autores e que vem sendo coletada em Mato Grosso do Sul (ALMEIDA *et al.*, 2010a; NASCIMENTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2010), no intra e peridomicílio.

O encontro dessa espécie em abundância em países vizinhos, como a Argentina (ROSA *et al.*, 2010; SALOMÓN; QUINTANA; ZAINDENBERG, 2008) mostra a necessidade de continuidade nos estudos referentes a capacidade vetorial da mesma nos diversos estados do Brasil, já que tem sido encontrada infectada naturalmente por *L. (L.) infantum chagasi* em outros estados (CARVALHO *et al.*, 2008).

## 2.3 Reservatórios da doença

O primeiro caso de Leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil foi relatado no Estado do Ceará por Chagas em 1938. Mais tarde, em 1956, Deane, confirmou, no mesmo estado, o papel do cão como reservatório doméstico do parasita. Do ponto de vista epidemiológico, esses animais têm sido encontrados infectados com prevalência superior e concomitantemente, em todos os focos endêmicos de doença humana, sendo considerados os principais elos na cadeia de transmissão da LVA (BARATA *et al.*, 2005; BIGELI; OLIVEIRA-JÚNIOR; TELES, 2012; SANTOS *et al.*, 2010).

A LVC apresenta amplo espectro de características clínicas que variam aparentemente de estado sadio a um severo final. De acordo com estas características, podem-se agrupar os animais em três categorias: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (CORTADA *et al.*, 2004).

Nos cães a doença apresenta um amplo espectro de formas clínicas, tendo evolução lenta e início insidioso (BLAVIER *et al.*, 2001; BRASIL, 2006; FEITOSA *et al.*, 2000) e deve ser investigada quando estiverem presentes alguns dos sinais clínicos mais frequentes: alopecia, úlcera cutânea, perda de peso, esplenomegalia, linfadenomegalia e onicogribose, nódulos de ulcerações, hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia.

Em Brasília (Distrito Federal) no ano de 2007, foi realizado o I Fórum de discussão sobre LVC sendo avaliados vários pontos relacionados à infecção canina com o objetivo de analisar as evidências sobre o tratamento em cães (COSTA, 2011).

Como resultado foi elaborada a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11/07/2008, que proíbe o tratamento da LVC com medicamentos para seres humanos ou através de produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009).

Com relação ao ciclo silvestre no Brasil, são reconhecidos como reservatórios as raposas, os marsupiais e alguns felídeos. Há registros de *Speothos venaticus* (“cachorro vinagre”) e dos felídeos *Panthera onca* (onça pintada) e *Felis concolor* (suçuarana) (DAHROUG *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; LAINSON, 2010).

*Cerdocyus thous* foi encontrada naturalmente infectada em Mato Grosso do Sul, Pará (LAINSON *et al.*, 1990), em Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2000) e em zoológico de Ilha Solteira, estado de São Paulo (JUSI *et al.*, 2011; MELLO *et al.*, 1988).

No Velho Mundo, como hospedeiros silvestres, têm sido descritos ainda o *Canis aureus* (chacal dourado), *Canis lupus* (lobo) e *Vulpes vulpes* (raposa), encontrados em áreas rurais remotas (LAINSON *et al.*, 1987; LAINSON, 2010).

Em Mato Grosso do Sul, a partir de 1980, começaram a ser relatados, em Corumbá e Ladário, casos caninos de LV. Estudos realizados em canídeos domésticos e silvestres daquela região confirmaram a presença de *L. (L.) infantum chagasi*, indicando a circulação do parasita em hospedeiros vertebrados diversos (NUNES *et al.*, 1988, SANTOS *et al.*, 1998).

Desde 1999 o município de Campo Grande vem relatando a presença de casos caninos. O aumento no número de animais soropositivos nos últimos dez anos demonstra um novo perfil epidemiológico da doença, onde os animais domésticos atuam como reservatórios da *Leishmania*, tanto em áreas rurais como em área urbana. Situação observada nas regiões de Anastácio, Três Lagoas e Bonito (ANDRADE *et al.*, 2009; CORTADA *et al.*, 2004; MATO GROSSO DO SUL, 2012; NUNES *et al.*, 2001; OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, 2010; SOUZA; ANDREOTTI; HONNER, 2007).

No Brasil, considera-se que a modalidade clássica de transmissão da LTA atribuída à *L. (V.) braziliensis* seja a silvestre, em que o homem adquire a protozoose ao adentrar seu foco natural, onde coexistem seus reservatórios naturais, ainda pouco conhecidos (BASANO; CAMARGO, 2004).

Há relatos de encontro de parasitas semelhantes, em: *Oryzomys concolor*, *Oryzomys capito*, *Oryzomys nigripes*, *Akodon arviculoides*, *Proechimys* spp., *Rattus rattus*, *Rhipidomys leucodactylus* (Rodentia) e *Didelphis marsupialis* (Marsupialia) todos no Brasil; na Venezuela, *Rattus rattus* e *Sigmodon hispidus* (Rodentia) (FORATTINI *et al.*, 1972; FORATTINI, 1973; LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 1970; LIMA *et al.*, 2002).

Pode-se, portanto, admitir, que as mudanças ecológicas que ocorreram no processo de colonização propiciaram o surgimento do ciclo doméstico ou peridoméstico de transmissão da protozoose, com a adaptação do parasita a animais domésticos (COSTA *et al.*, 2007; LEMOS; LIMA, 2005).

## **2.4 Infecção natural de vetores por flagelados e técnicas moleculares**

Dentre os diversos parâmetros existentes que indicam a incriminação de uma espécie como vetora de um tipo de parasita, destacam-se: a distribuição geográfica, que

deve ser coincidente com a doença e com a competência vetorial, a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito (CASANOVA *et al.*, 1995; GALATI *et al.*, 1996).

A taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação correta da espécie de *Leishmania* em uma determinada espécie de vetor são de grande importância na epidemiologia das leishmanioses. Segundo Michalsky *et al.* (2002), apesar da existência de relatos de encontros desses protozoários no tubo digestivo de flebotomíneos, a natureza dessas infecções por *Leishmania* só pode ser determinada pela realização de técnicas de isolamento ou inoculações experimentais.

A partir da década de 80, diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa das *Leishmanias*, eliminando a necessidade de seu isolamento em cultura. Métodos de diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), constituem uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois podem chegar a 94% de sensibilidade (ROSA, 2010).

A pesquisa de flagelados no tubo digestivo do vetor e a identificação da espécie do parasita, normalmente são realizadas por observação microscópica após dissecação ou tentativa de isolamento do agente proveniente de insetos em meio de cultura (OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006).

Tipicamente a PCR permite a amplificação de um número pequeno de moléculas-alvo de DNA. A análise da taxa de infecção das diferentes espécies de *Leishmania* nos insetos vetores que ocorrem em área endêmica, auxilia na compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle da parasitose (MICHALSKY *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2008).

A PCR pode ser utilizada como um instrumento na identificação do parasita em materiais biológicos diversos, auxiliando no diagnóstico humano e canino, além de detectar a presença dos mesmos em flebotomíneos. Esta técnica tem sido aplicada para analisar as variadas amostras destes insetos provenientes do campo, tendo em vista a dificuldade na detecção, identificação e caracterização dos organismos infectantes pelos métodos convencionais (MICHALSKY *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Ao analisar a presença de protozoários do gênero *Leishmania* em flebotomíneos, deve-se levar em consideração o fato da sensibilidade da técnica de PCR variar de acordo com a quantidade de parasita presente no vetor. Em estudo desenvolvido por Silva e colaboradores (2008) observou-se que dentre as amostras de vetores coletadas, havia baixa quantidade de DNA do parasita, não sendo possível identificar o complexo

*Leishmania* através da amplificação do produto, mas sendo sugerida a possibilidade da infecção pelo protozoário.

A utilização de iniciadores que amplificam as sequências específicas do parasita serve como ferramenta de auxílio nos estudos de incriminação vetorial (PAIVA *et al.*, 2007), pois podem levar à correta identificação do gênero *Leishmania* em amostras de flebotomíneos (SILVA *et al.*, 2008).

Estudos realizados com a finalidade de identificar um alvo para o correto diagnóstico das leishmanioses demonstram que a região ITS 1 (Internal Transcribed Spacer 1), que difere as espécies em tamanho e sequência, demonstrou ser eficiente na detecção de todas as *Leishmanias* conhecidas (ROSA, 2010).

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

## **2.5 Dados ambientais e espaciais**

Desde 1972, após o lançamento do primeiro satélite de recursos terrestres, o LANDSAT-1, vários estudos de levantamento, análise e monitoramento de recursos naturais com o uso de imagens orbitais, foram realizados. A observação da Terra por meio de sensores remotos é uma forma eficaz e econômica de coletar os dados necessários para monitorar e modelar fenômenos que ocorrem na superfície terrestre, especialmente em países de grande extensão territorial, como o Brasil (SILVA, 2005).

Os sistemas e técnicas de sensoriamento remoto podem permitir o estudo da evolução ambiental de uma região, através de análises multitemporais, estabelecendo comparações de uma mesma paisagem entre dois ou mais períodos, podendo desta forma, auxiliar no monitoramento ambiental da região (SHIMABUKURO *et al.*, 1998).

As imagens de satélite têm sido uma das principais fontes de informação para a produção de novos mapas, por melhor auxiliar a determinação do uso e da cobertura do solo, além de ter custo relativamente baixo e periodicidade de informações (CÂMARA; MEDEIROS, 1996).

Conforme Aparício e Bitencourt (2004), as análises paisagísticas confirmam a utilidade do sensoriamento remoto e do geoprocessamento aplicado à epidemiologia. Essa tecnologia permite qualificar e quantificar as variáveis em pequena ou larga escala, apresentando avanço significativo para os profissionais da área de saúde.

O geoprocessamento é o conjunto de técnicas de coleta, tratamento, manipulação, análise e apresentação de dados espaciais ou de informações geográficas georreferenciadas no qual há utilização de diferentes técnicas. Há as de digitalização de imagens, conversão de dados, de modelagem espacial e o de informações geográficas, usualmente denominado de SIG (PARANHOS-FILHO *et al.*, 2008).

O Sistema de Informação Geográfica (SIG), do inglês *GIS – Geographic Information System* – permite a sobreposição de diferentes cartas de um mesmo local. Este tipo de trabalho permite evidenciar e caracterizar as modificações ocorridas no tipo de cobertura do solo de um determinado local, pois simulam a realidade de espaço geográfico. (PARANHOS-FILHO, *et al.*, 2008).

Vários autores vêm utilizando as geotecnologias de modo geral para estudos em áreas com casos de leishmanioses. A ocorrência de flebotomíneos relaciona-se aos ambientes modificados e àqueles com presença de matas (LAINSON; RANGEL, 2005), assim todas as vezes que fatores como vegetação, umidade e temperatura de um local são analisadas, indiretamente as condições de desenvolvimento do vetor são avaliadas.

O índice de vegetação por diferença normalizada, do inglês (*normalized difference vegetation index* - NDVI) é utilizado para estudar e avaliar a cobertura vegetal, além de ser indicativo da quantidade de fitomassa da região, ou seja, quanto maior o índice, maior a densidade da vegetação (APARÍCIO; BITTENCOURT, 2004; PONZONI; SHIMABUKURO, 2007).

No Brasil, diversos autores vêm utilizando geotecnologias como ferramentas de auxílio na análise dos padrões epidemiológicos das leishmanioses, além de analisarem o NDVI das regiões para estabelecer possíveis correlações. Margonari *et al.* (2006) utilizaram o geoprocessamento para correlacionar casos humanos e caninos em Belo Horizonte. Donalisio *et al.* (2012) verificaram a distribuição microespacial dos vetores da leishmaniose tegumentar em Pernambuco, correlacionando-os com a cobertura vegetal da região por meio do NDVI.

Aparício e Bitencourt (2004) correlacionaram variáveis ambientais para espacializar zonas de risco entre o homem e o vetor em área de LTA. Carneiro *et al.*

(2004) utilizaram o georreferenciamento para delimitar área de risco de LVA através do NDVI na Bahia.

Em Mato Grosso do Sul, Antonialli *et al.* (2007) utilizaram a análise espacial para demonstrar os padrões de evolução da LVA no Estado. Oliveira *et al.* (2012) avaliaram a influência das variáveis ambientais por meio do NDVI correlacionando com a distribuição de *Lu. longipalpis* e dos casos caninos e humanos de LV em Campo Grande.

Esses estudos apontam como as geotecnologias podem ser utilizadas como método auxiliar na detecção de mudanças ecológicas e delimitar áreas de risco objetivando subsidiar a elaboração de estratégias de controle das leishmanioses.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a fauna flebotomínea e os aspectos ambientais relacionados à transmissão da leishmaniose visceral americana em Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2009 e 2010.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Para o alcance do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) caracterizar a fauna flebotomínea da área urbana de Ponta Porã e estudar a diversidade e índice de abundância para as espécies coletadas;
- b) correlacionar a distribuição da espécie mais abundante com os variáveis climáticas (precipitação e temperatura);
- c) avaliar a correlação entre os casos caninos e humanos de LV com a distribuição espacial de flebotomíneos;
- d) detectar a infecção natural de flebotomíneos capturados na área urbana de Ponta Porã;
- e) proceder a identificação de flagelados detectados nos insetos através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase);
- f) correlacionar o número de flebotomíneos capturados com os dados referentes ao meio ambiente utilizando os índices de NDVI, NDWI e SAVI.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo e período da pesquisa**

A pesquisa configura-se como estudo seccional realizado no período de 2009 a 2010, na área urbana de Ponta Porã, MS.

### **4.2 Área de estudo**

O Estado de Mato Grosso do Sul está localizado na região Centro-Oeste, com superfície de 358,2 mil Km<sup>2</sup>. Limita-se a leste com Minas Gerais, São Paulo e Paraná; ao norte, com Mato Grosso e Goiás, fazendo também limites internacionais com a Bolívia e Paraguai (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Sua população estimada é de 2.033.855 habitantes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011) com 78 municípios, divididos em quatro mesorregiões: Centro-Norte, Leste, Sudoeste e Pantanal. Sua capital é a cidade de Campo Grande. Do ponto de vista geográfico, apresenta duas grandes unidades. O Planalto Sedimentar da Bacia do rio Paraná situado a leste e a planície do Pantanal sul-mato-grossense a oeste.

O clima, segundo classificação de Koppen, apresenta-se em dois tipos: o de maior abrangência na área é o tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno (AW) e o mesotérmico úmido sem estiagem (CFA) em que a temperatura do mês mais quente é superior a 22°C, apresentando no mês mais seco precipitação superior a 30 mm, sendo sua área de ocorrência localizada ao sul do Estado. As temperaturas médias do mês mais frio estão entre 14°C e 15°C, sendo que as mínimas absolutas de inverno são baixas, de 4°C a 6°C, nas invasões polares de inverno (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

A vegetação reflete o contato e a interpenetração de três províncias florísticas: Amazônica, Chaquenha e da Bacia do Paraná, resultando em paisagens fitogeográficas muito diversificadas.

O Estado caracteriza-se por apresentar quatro regiões fitoecológicas distintas: savana (cerrado), denominação utilizada para as várias formações de estrutura predominantemente campestre, intercalada por pequenas plantas lenhosas até arbóreas

e em geral serpenteadas por floresta-de-galeria; que se encontra praticamente em todo o Estado, *floresta estacional decidual* que cobre os terrenos predominantemente calcários do Planalto da Bodoquena e as elevações da depressão do rio Paraguai, compreendidos entre as altitudes de 100 a 150 metros acima do nível do mar e floresta estacional semidecidual, situada na porção sul e sudeste do Estado, recobrando os terrenos mais elevados e de litologias mais antigas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

O Município de Ponta Porã está localizado na porção Sul de Mato Grosso do Sul, na microrregião de Dourados, distante 326 km da capital Campo Grande. Situa-se entre as coordenadas geográficas de 22° 53' e 10" latitude sul e 55° 42' e 32" longitude oeste, a uma altitude média de 655 m acima do nível do mar (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Localização geográfica do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011).

Sua população atual é de 79.173 habitantes dos quais 89% moram na zona urbana e 11% na zona rural, tendo densidade demográfica de 14,61 (habitantes/km<sup>2</sup>) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Tem em sua vegetação a predominância dos campos limpos como característica do município, formado por grandes áreas de gramíneas rasteiras, constituindo as famosas pastagens naturais. Predomina o clima tropical de altitude com inverno seco e com temperatura média anual de 20,6 °C e temperatura média mensal de 23°C. O mês mais quente é fevereiro, com temperatura média de 23,6 °C, e o mês mais frio é julho, com média de 16,4 °C (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

A precipitação média anual é de 1.660 mm, com períodos de verão mais úmidos que os de inverno. O mês mais chuvoso é novembro, com média de 212 mm, enquanto o mais seco é julho, com média de 55 mm. Encontra-se sob influência da Bacia do Rio da Prata, sendo atendido principalmente pelo rio Dourados (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

O município de Ponta Porã faz divisa ao norte com Antônio João, Bela Vista, Jardim e Guia Lopes da Laguna; ao sul com Aral Moreira e Laguna Carapã; ao leste com Dourados e Maracaju e ao oeste com a República do Paraguai. Possui dois distritos: Cabeceira do Apa e Sanga Puitã e pertence a bacia hidrográfica do Rio Paraná ocupando uma área total de 5.330,461 km<sup>2</sup> (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Tem como atividades econômicas a pecuária, agricultura e a extração de madeiras. Ponta Porã é município de fronteira, com elevado crescimento na área do turismo, dispendo de uma rede hoteleira com cerca de 20 unidades. A cidade é separada de Pedro Juan Caballero por meio de fronteira seca, sem quaisquer barreiras geográficas, fato que facilita o trânsito de pessoas e animais entre os dois países (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

### **4.3 Coleta de flebotomíneos**

Os flebotomíneos foram capturados com armadilhas automáticas luminosas modificadas modelo CDC (NATAL, 1991) entre os meses de abril de 2009 a março de 2010, totalizando o período de um ano. A instalação foi feita quinzenalmente, com auxílio dos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Ponta Porã, no intradomicílio e

peridomicílio de sete pontos da cidade, totalizando 14 ecótopos (Figura 4). Foram realizadas capturas mensais com armadilha de Shannon, instalada em um dos pontos de coleta.

Figura 4 - Armadilha automática luminosa modificada modelo CDC instalada no intradomicílio (a) e peridomicílio (b) de uma residência em área urbana do município de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul

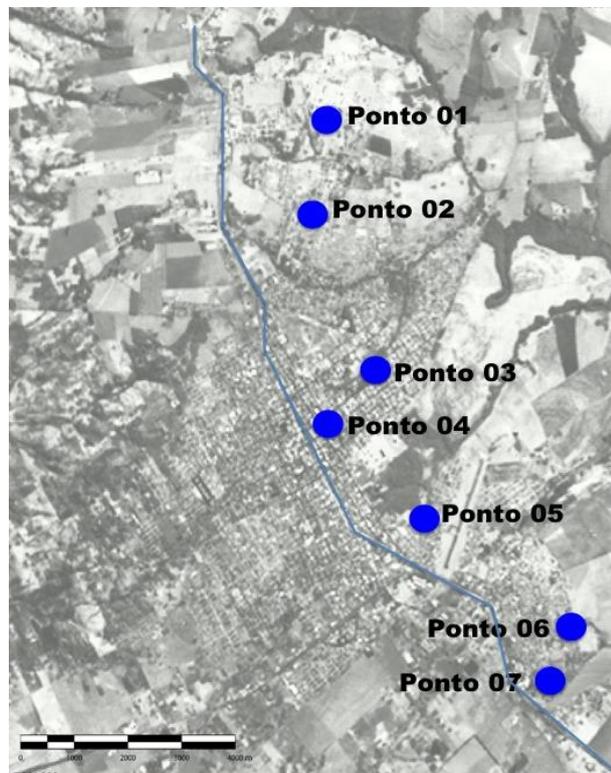


Fonte: Andrade (2010a).

O período de captura dos vetores ocorreu das 18:00 às 06:00 horas, sem obedecer ao horário de verão.

Os pontos de coleta foram escolhidos de maneira que abrangessem toda a área urbana, respeitando as regiões já definidas para as ações de saúde do município, como pode ser visualizado na figura 5.

Figura 5- Pontos de captura de vetores selecionados na área urbana de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil



Nota: Ao lado esquerdo do mapa encontra-se o município de Pedro Juan Caballero (Paraguai) e ao lado direito Ponta Porã (Brasil). A linha azul delimita a fronteira entre os dois países.

As armadilhas foram instaladas em sete pontos distribuídos em diferentes bairros: Ponto 1 (Área 1: Bairro Jardim Ivone), Ponto 2 (Área 2: Bairro Jardim das Paineiras), Ponto 3 (Área 3: Centro), Ponto 4 (Área 4: Bairro São João), Ponto 5 (Área 5: Bairro da Granja), Ponto 6 (Área 6: Jardim Altos da Glória) e Ponto 7 (Área 7: Bairro São Francisco).

O Ponto 1 localizado no bairro Jardim Ivone possui aproximadamente 10.500m<sup>2</sup> com criação de cavalos e de gado. Há apenas uma residência no terreno e na área externa da mesma há uma coleção de árvores frutíferas (Jaboticabeiras, Pés-de-acerola, Laranjeiras, Mangueiras e Goiabeiras), além de diversas árvores espalhadas pelo terreno.

Há existência de quatro cães na localidade que não ficam acomodados em canis e circulam livremente no intradomicílio; há, ainda, cavalos que ficam confinados em um galpão contendo dezesseis baias. O ambiente é limpo e quase não se observa acúmulo de matéria orgânica. Neste local funciona um haras e há espaço para treinos com os cavalos em área próxima da residência. As armadilhas foram instaladas na lavanderia

interna da casa (intradomicílio) e perto das baias dos cavalos na área externa (peridomicílio).

O Ponto 2, localizado no bairro Jardim das Paineiras, constitui-se de uma casa pequena em um terreno de cerca de 230m<sup>2</sup>. A proprietária cria patos, galinhas e cães, sendo que o abrigo desses animais fica no peridomicílio próximo a janela do quarto da moradora. Há presença de quatro bananeiras e de árvores diversas no quintal, além de entulhos e resto de material utilizado em construção.

O galinheiro fica perto do depósito de entulhos e a proprietária usa o mesmo como depósito de lixo. Não foi constatada a presença de canil e as armadilhas foram instaladas na sala da residência (intradomicílio) e no galinheiro (peridomicílio).

O Ponto 3 localiza-se na área central da cidade. Neste terreno há presença de umamata remanescente com nascente preservada onde constatou-se a presença de aves e primatas e devido à presença da nascente é percebido no local elevada umidade. Observou-se presença de cães em todas as três residências existentes no terreno.

Além das residências, há no terreno um hotel que recebe um fluxo grande de turistas durante o ano todo. O local possui área aproximada de 23.050 m<sup>2</sup> com presença de um galinheiro na casa principal. As armadilhas foram instaladas na sala (intradomicílio) de uma das residências construída próxima à saída do hotel e no interior do galinheiro (peridomicílio). Os moradores dessa casa, que serviu como ponto de coleta, já haviam tido um cão positivo para leishmaniose e mantinham mais três animais no local.

O galinheiro encontra-se cerca de 20 metros da borda da mata e essas aves se mantêm confinadas durante todo o dia. Há presença de várias árvores frutíferas e de dois pomares no peridomicílio.

No Ponto 3 houve a instalação da armadilha de Shannon na cor branca (Figura 6). Essa armadilha, conhecida como “Barraca de Shannon”, foi utilizada mensalmente para verificar quais as espécies de flebotomíneos existentes na localidade e a antropofilia das mesmas.

A armadilha foi instalada dentro da coleção de mata, cerca de 50 metros da nascente. O ponto 3 foi escolhido como local para instalação da armadilha, por estar localizado em área central e por possuir farta vegetação no entorno.

Esta armadilha, descrita inicialmente por Shannon (1939), foi adaptada em suas medidas por diversos autores (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Dois indivíduos capturavam

manualmente com auxílio de tubos coletores identificados com o horário da coleta. Os flebotomíneos foram acondicionados até o momento do exame em pote de gesso úmido.

Figura 6 - Coleta manual de flebotomíneos utilizando a armadilha de Shannon na cor branca, instalada em área urbana da cidade de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul



Fonte:Andrade (2010b)

O Ponto 4 está localizado no bairro São João e a residência possui aproximadamente 85 m<sup>2</sup> e o terreno cerca de 320 m<sup>2</sup>. A proprietária tem como animais de estimação um cão e um cavalo, este último sendo mantido em um estábulo. Há presença de galinheiro próximo ao banheiro e as aves são criadas soltas, sendo confinadas apenas durante a noite.

No peridomicílio nota-se a presença de Pés de laranja, sendo observado no terreno acúmulo de folhas e de fezes de animais. As armadilhas foram instaladas na sala (intradomicílio) e no galinheiro (peridomicílio).

O Ponto 5 está localizado no bairro da Granja, próximo à área de treinamento militar, com cerca de 340 m<sup>2</sup>, a 50m de um córrego. Nesse terreno encontram-se duas casas, sendo que a utilizada como ponto de captura fica nas proximidades da área de mata. As armadilhas foram instaladas na sala (intradomicílio) e em uma bananeira próxima a área de mata (peridomicílio).

Os proprietários criavam um cão na varanda e notou-se a presença de muitas bananeiras no quintal, sendo que o terreno possui área com depósito de entulhos, mas o intradomicílio apresentou-se limpo durante todas as idas. Não foi observada presença de aves no entorno.

O Ponto de captura 6 encontra-se no bairro denominado Jardim Altos da Glória e o terreno possui cerca de 500m<sup>2</sup>. No local não há animais de estimação, mas os proprietários haviam tido seu cão recolhido pelo Centro de Controle de Zoonoses há cerca de três meses antes do início da pesquisa, pelo fato do mesmo ter apresentado sorologia positiva para leishmaniose. As armadilhas foram instaladas na lavanderia interna da casa (intradomicílio) e próximo ao galinheiro (peridomicílio).

O peridomicílio é bem cuidado no tocante a limpeza e no terreno observou-se a presença de um pé de manga e de um poço do qual os proprietários retiram a água para utilização diária. O galinheiro foi construído longe da casa e estava desativado durante o período de captura.

O Ponto 7 encontra-se no bairro São Francisco, local com 600 m<sup>2</sup> e com extensa criação de porcos, cães, cavalos e galinhas; há presença de um lago próximo à residência e muita matéria orgânica no peridomicílio.

Notava-se presença de canil e baias para os animais, mas de acordo com o proprietário os animais circulam livremente pelo terreno e interior da residência durante todo o período do dia. Observa-se a presença de Pés de acerola e de uma Mangueira. As armadilhas foram instaladas na sala (intradomicílio) e no galinheiro (peridomicílio).

O proprietário trabalhava com reciclagem e possuía um pequeno depósito próximo aos quartos e muitos pneus velhos acumulados ao lado do galinheiro.

Na frente do terreno haviam duas casas, todas elas com presença de cães e apresentando variedade de árvores no entorno (Figura 7).

Figura 7 – Pontos de captura dos flebotomíneos em área urbana de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil: (A) Ponto 1, (B) Ponto 2, (C) Ponto 3, (D) Ponto 4, (E) Ponto 5, (F) Ponto 6, (G) Ponto 7.



Fonte: Andrade (2010c)

## 4.4 Métodos para análise dos dados

### 4.4.1 Fauna flebotomínea

#### 4.4.1.1 Infecção natural e verificação de espécies

Os flebotomíneos capturados foram separados dos demais insetos e os machos e fêmeas foram acondicionados em placas de Petri e mantidos sob refrigeração, para serem encaminhados posteriormente ao laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. No laboratório foi feita a clarificação segundo metodologia proposta por Forattini (1973) e em seguida foram montados em lâminas.

Para a identificação das espécies foram utilizadas as estruturas da cabeça, tórax e abdome. Em nível específico a ênfase foi dada à classificação proposta por Galati (2003; 2004) a abreviação proposta por Marcondes (2007).

Para a pesquisa de parasitas no tubo digestório das fêmeas coletadas através da armadilha de Shannon utilizou-se a dissecação, método mais comumente utilizado na pesquisa de infecção natural, de acordo com metodologia previamente descrita por LAINSON (1997).

As fêmeas foram colocadas em lâmina seca para retirada de asas e patas. A dissecação foi feita em microscópio estereoscópio com auxílio de estiletos. Nas lâminas foi colocada uma gota de solução salina estéril (0,9%), onde se completou a dissecação, fazendo-se dois cortes na porção final do abdômen e com movimentos de ziguezague retirou-se o tubo digestório, o qual foi coberto com lamínula e examinado ao microscópio óptico em aumento de 400 vezes, para identificação da espécie de flebotomíneo e a pesquisa de flagelados.

#### 4.4.1.2 Índice de abundância das espécies padronizado (IAEP)

O IAEP refere-se à abundância de uma determinada espécie em relação à das demais num determinado espaço e tempo. No seu cálculo são considerados o número de indivíduos capturados de cada uma das espécies, em cada um dos ecótopos amostrados de um determinado local e período.

Para o cálculo da abundância das espécies de flebotomíneos, utilizou-se o Índice de Abundância das Espécies (IAE), conforme Roberts e Hsi (1979), seguindo a fórmula:

$$IAE = \frac{A + R_j}{K}$$

Onde:

A = número de ecótopos de captura em que a espécie esteve ausente x c;

R<sub>j</sub> = somatória das posições no “ranking” de cada espécie;

K = número de ecótopos de captura.

Convertendo-se os valores obtidos de IAE em uma escala entre zero e 1 obtém-se o Índice de Abundância Padronizado (IAEP). Neste índice, o valor 1 ou mais próximo de 1 corresponde à espécie mais abundante e o mais próximo de zero à menos abundante. A fórmula para o cálculo do IAEP é:

$$IAEP = \frac{c - IAE}{c - 1}$$

Onde:

c = maior valor obtido no “ranking” das espécies, segundo suas frequências em cada ecótopo de captura, considerando todos os ecótopos + 1.

#### 4.4.1.3 Média Geométrica de Williams

A média geométrica de Williams é uma média geométrica modificada, sendo, portanto, uma medida de tendência central que reflete a frequência e a regularidade das espécies nas coletas (HADOW, 1960). Foi utilizada para avaliar a atividade da espécie de flebotomíneo mais abundante.

A fórmula utilizada para o cálculo é:

$$\bar{X}_w = \left[ \text{antilog} \left( \frac{\sum \log y_{1+1} + \log(y_{2+1}) \dots \log(y_{n+1})}{N} \right) \right]^{-1}$$

Onde y é cada valor de uma série de n observações.

#### 4.4.1.4 Índice de Shannon (H)

É um dos índices capaz de analisar a diversidade de espécies em um determinado ambiente. O Índice de Shannon foi utilizado para calcular a relação entre o número de espécies e o número de indivíduos capturados em um determinado ecótopo, que permite a comparação entre comunidades, pois uma pode ser mais rica em espécies do que a outra, mas não necessariamente em indivíduos, por unidade de área (HAYEK; BUZAS, 1997). A fórmula utilizada foi a de Shannon (H).

$$H = - \sum p_i \ln (p_i)$$

Onde:  $p_i$  = proporção de espécimes encontrada da enésima espécie

Quando apenas uma espécie predomina absolutamente, H é menor do que quando várias espécies contribuem substancialmente. Quando a proporção das espécies é a mesma para todas as espécies H apresenta o máximo valor possível.

#### 4.4.1.5 Índice de Pielou (J)

Utilizado para medir a proporção com que cada espécie contribui na comunidade de um determinado ecótopo. Quando todas as espécies apresentam a mesma proporção de indivíduos é dito que há a máxima equitabilidade. Todavia esta situação não é muito comum de ocorrer. Assim, Pielou introduziu uma medida considerada como uma medida de equitabilidade ou de dominância.

$$J = \frac{H}{\ln(S)}$$

Onde

S = nº de espécies

H = índice de Shannon,

Quando apenas uma espécie ou poucas delas são dominantes, o valor de J é baixo. Quando há uma proporção mais igualitária entre as espécies, o valor de J é mais alto (HAYEK; BUZAS, 1997).

#### 4.4.1.6 Frequência relativa

Para avaliar a frequência relativa das espécies de flebotomíneos, foi utilizado o método de porcentagem, que pode ser definida como a fração de um número inteiro expressa em centésimos, serve para distinguir a quantidade de valores pela quantidade total de valores. A fórmula é a seguinte:

$$\frac{fr (\%) = n_i * 100}{n}$$

Onde:

$n_i$  = nº de indivíduos coletados por espécie

$n$  = nº total de indivíduos coletados

$fr (\%)$  = frequência relativa

#### 4.4.2 Análise molecular

##### 4.4.2.1 Taxa mínima de infecção

Pelo fato das fêmeas coletadas estarem em sua maioria acondicionadas em *pools*, calculou-se a taxa mínima de infecção dos flebotomíneos, adotando para tanto a fórmula proposta por Paiva *et al.* (2007):

Taxa mínima (TM) = número de grupos positivos x 100/número total de insetos.

##### 4.4.2.2 Extração do DNA de *Leishmania*

As extrações foram realizadas individualmente ou em *pools* de dois a seis flebotomíneos por tubo, classificados de acordo com a data de captura, ponto de coleta e espécie capturada. O método utilizado foi fenol-clorofórmio (Anexo A).

##### 4.4.2.3 Reação em cadeia da polimerase

O DNA extraído das amostras foi utilizado para realizar a detecção do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que foi primeiramente padronizada.

Condições da PCR: o DNA extraído foi amplificado usando os iniciadores 13 A e 13 B. A mistura da reação (25µL) foi preparada contendo: tampão 1X da Invitrogen, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 pmol de cada iniciador A (5'- TCT TGC GGG GAG GGG GTG - 3') e B (5'- TTG ACC CCC AAC CAC ATT TTA - 3'), descritos por Rodgers *et al.* (1990), que amplificam o fragmento conservado do minicírculo de KDNA de *Leishmania*, duas unidades de Taq polimerase Invitrogen e 5µL de DNA e 19,75 µL de água.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador BIOER® modelo XP cycler utilizando-se aquecimento inicial de 95°C durante 5 minutos,

Posteriormente foram realizados 30 ciclos, cada um deles divididos em três etapas: desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (54,5°C por 1 minuto) e polimerização (72°C por 30 segundos). Em seguida o material foi mantido a 72°C durante 10 minutos (extensão final) e o produto amplificado foi estocado a 4°C até a sua análise.

Em todas as reações foi incluído um controle positivo (C+) e um controle negativo (C-) (mix + água). As reações foram padronizadas com o DNA controle fornecido pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil): *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), que também foi o controle positivo das reações.

O produto de PCR esperado foi estimado em 120pb o que é característico para espécies do gênero *Leishmania*.

#### 4.4.2.4 Eletroforese em gel de agarose

A verificação da amplificação do fragmento de DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando-se 12 µL do produto da PCR acrescidos de 3µL de tampão da amostra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol) por eletroforese submarina horizontal em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA) 1X, pH 8,0 a 80v e 400 mA para 13A/13B .

Após a eletroforese, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e os produtos de amplificação foram visualizados e fotografados em luz ultravioleta em transiluminador (Macro Vue UV-20) da Amersham Pharmacia. Para a detecção da presença de um fragmento de 120pb para o gênero *Leishmania* foi utilizado o marcador molecular de DNA de 50 pb e controle positivo.

#### 4.4.2.5 Reação em cadeia da polimerase para região ITS-1

Para a amplificação da Região ITS-1 utilizou os iniciadores L5.8S (5-TGATACCACTTATCGCACTT LITSR (5-CTGGATCATTTTCCGATG- 3) (El TIE *et al.* 2000). As reações foram padronizadas com os DNA controle, fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil): *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75) que também foram os controles positivos das reações. O produto final esperado foi de 320pb.

#### 4.4.2.6 Purificação com o produto de PCR

Os produtos das PCR para região ITS-1 foram purificados utilizando-se o Kit de purificação QIAquick PCR purification (QIAGEN, Chatsworth, CA) de acordo com as especificações do fabricante.

#### 4.4.2.7 Sequenciamento

A amostra positiva foi sequenciada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)/ (Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron) ABTLuS na cidade de Campinas, São Paulo.

#### 4.4.2.8 Alinhamento

A análise e o alinhamento da sequência de nucleotídeo editada foi realizada com o auxílio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 5.0 e Blast do site do NCBI - National Center for Biotechnology Information para identificação das espécies a partir dos produtos da PCR/ITS-1.

#### 4.4.3 Casos humanos e caninos

Foram utilizados os dados de notificação de todos os casos humanos e caninos de abril de 2009 a março de 2010. Os casos humanos de LVA notificados e endereço foram retirados da base de dados da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do

Sul e as notificações dos casos caninos de LVA e endereço foram fornecidas pelo Centro de controle de zoonoses de Ponta Porã (CCZ).

#### **4.5 Dados climáticos**

Os dados climáticos referentes aos meses de abril de 2009 a março de 2010 foram obtidos no Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (2010), vinculado ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Com esses dados foi calculada a média aritmética mensal de temperatura e precipitações pluviométricas.

#### **4.6 Análises estatísticas**

A análise da correlação entre as variáveis coletadas foi feita através do Teste de Correlação Linear de Pearson, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Esse teste foi utilizado para estimar a associação entre total de exemplares capturados com a média de temperatura e precipitação, associação entre os vetores, casos caninos e casos humanos registrados, entre índice de cobertura vegetal e umidade com o número de vetores e casos de leishmaniose. A frequência de distribuição dos flebotomíneos nos ambientes estudados, bem como do ambiente de captura (intra ou peridomicílio) foi analisada utilizando-se o teste do Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%.

Para tabulação dos dados utilizou-se o *software* Microsoft Office Excel 2010 (MICROSOFT, 2010). Os testes de normalidade e os testes de aderência foram feitos no programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). Para os testes de correlação utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.0 (GRAPHPAD SOFTWARE, 2011).

#### **4.7 Dados espaciais e ambientais**

Como base cartográfica foi utilizada uma imagem de 18 de agosto de 2010 do satélite Landsat 5, sensor TM, órbita-ponto 225/076, disponível gratuitamente no site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2010).

Para o georreferenciamento dessa imagem foi utilizada uma cena ortorretificada do satélite Landsat 7, sensor ETM+, órbita-ponto 225/076, de 8 de abril de 2000, previamente corrigida. A projeção e *datum* adotados foram respectivamente UTM (zona 21) e WGS84 (GLOBAL LAND COVER FACILITY, 2000).

Após esta etapa foi feita a correção atmosférica da imagem no *software* Geomatica (PCI, 2009), através do algoritmo atcor2. Sobre a imagem corrigida foram calculados o *Normalized Difference Vegetation Index* (NDVI) (DE ROUSE De Rouse *et al.* (1974), o *Normalized Difference Water Index* (NDWI) e o *Soil Adjusted Vegetation Index* (SAVI).

O NDVI permite caracterizar parâmetros biofísicos da vegetação, como fitomassa/densidade da vegetação e seu valor é normalizado para o intervalo de -1,00 a +1,00 (PONZONI; SHIMABUKURO, 2007). Esses valores representam uma medida indireta da fitomassa, indicando valores de matéria e energia presentes na área amostrada.

O NDVI é calculado pela seguinte relação:

$$\text{NDVI} = \text{NI} - \text{RNIR} + \text{R}$$

Onde:

NIR: Reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo.

R: Reflectância da vegetação na banda do vermelho.

O NDVI comprovadamente tem limitações causadas pelo ruído de fundo do solo, que é dependente da vegetação, do tipo de solo e da umidade. Assim, foi utilizado o SAVI, que varia de 0,00 a + 1,00 índice proposto por Huete (1988) que permite o ajuste do fundo do solo (L).

$$\text{SAVI} = (1 + \text{L})\text{NIR} - \text{RNIR} + \text{R} + \text{L}$$

O NDWI é um índice que reflete o teor de água na vegetação (*vegetation water index* - VWC) e o VWC é um parâmetro importante em estudos de vegetação e umidade do solo sendo que seu valor varia de -1,00 a +1,00. Gao (1996) desenvolveu o NDWI para a determinação do VWC, sendo o NDWI dado por:

$$\text{NDWI} = \text{NIR} - \text{SWIRNIR} + \text{SWIR}$$

Onde:

NIR: Reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo.

SWIR: Reflectância da vegetação na banda do infravermelho médio.

#### **4.8 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obtendo parecer favorável constante da carta de aprovação emitida no dia 30 de março de 2009 e registrada com o protocolo número 1360 (Anexo B).

## 5 RESULTADOS

Foram capturados na área urbana de Ponta Porã, 862 exemplares de flebotomíneos, sendo 677 machos (78,54%) e 185 fêmeas (21,46%) em uma proporção significativa de 3,66:1 ( $p < 0,0001$ ).

Dos insetos coletados, 707 foram capturados através de armadilhas automáticas luminosas modificadas, dentre estes 565 pertenciam ao sexo masculino e 142 ao sexo feminino, em uma proporção de machos para fêmeas de 3,97:1 ( $p < 0,0001$ ). Dos exemplares coletados 435 (61,5%) foram capturados no intradomicílio e 272 (38,5%) no peridomicílio ( $p < 0,0001$ ), sendo 79,92% machos e 20,08 % fêmeas.

As espécies coletadas com armadilha CDC são pertencentes a três sub-tribos, cinco gêneros e cinco espécies Lutzomyiina - *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Evandromyia cortelezzii* (Brethes, 1923); Bumptomyiina - *Brumptomyia brumpti* (Larousse, 1920); Psychodopygina - *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929).

*Lu. longipalpis* foi a espécie mais frequente, representando 686 (97,03%) dos exemplares coletados. Também foi a única encontrada em todos os locais de captura, ocorrendo exclusivamente em oito dos 14 ecótopos de Ponta Porã. A segunda espécie mais frequente, mesmo com valores nitidamente abaixo de *Lu. longipalpis* foi *Ny. whitmani* (Tabela 1).

Os índices de Shannon (H) e Pielou (J) tiveram valor igual a zero em todos os pontos de captura com exceção do Ponto 2 e do Ponto 3. O índice de Shannon variou de  $H = 0$  a  $H = 0,24$  e o índice de Pielou (J) variou de  $J = 0$  a  $J = 0,22$  (Tabela 1).

Tabela 1- Flebotomíneos capturados quinzenalmente com armadilhas automáticas luminosas modificadas modelo CDC, nos meses de abril de 2009 a março de 2010 em 14 ecótopos da cidade de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil

	Ponto 1				Ponto 2				Ponto 3				Ponto 4			
	Intradomicílio		Peridomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	-	-	-	-
<i>Ev. cortelezzii</i>	-	-	-	-	-	02	-	-	-	03	-	-	-	-	-	-
<i>Lu. longipalpis</i>	02	-	01	-	62	14	79	10	106	30	89	16	157	50	59	06
<i>Ny. whitmani</i>	-	-	-	-	02	01	01	02	-	01	01	-	-	-	-	-
<i>Pa. shannoni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	04	01	-	-	-	-
TOTAL	02	-	01		64	17	80	12	106	36	94	18	157	50	59	06
SHANNON(H)	0		0		0,21		0,12		0,22		0,24		0		0	
PIELOU(J)	0		0		0,19		0,17		0,16		0,22		0		0	
	Ponto 5				Ponto 6				Ponto 7				Total		Total	
	Intradomicílio		Peridomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio		M	F	MF	%
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F				
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	01	0,14
<i>Ev. cortelezzii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	05	0,71
<i>Lu. longipalpis</i>	-	02	-	01	01	-	01	-	-	-	-	-	557	129	686	97,03
<i>Ny. whitmani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04	04	08	1,13
<i>Pa. shannoni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04	03	07	0,99
TOTAL	02		01		01	01						565		142	707	100
SHANNON(H)	0		0		0	0		0		0		0,17				
PIELOU(J)	0		0		0	0		0		0		0,11				

M = machos; F = fêmeas; Br.= *Brumptomyia*; Ev.= *Evandromyia*; Lu.= *Lutzomyia*; Ny.= *Nyssomyia*; Pa.= *Psathyromyia*

Através da armadilha de Shannon foram capturados 155 exemplares, sendo 112 (72,3%) machos e 43 (27,7%), na proporção de 2,6:1. Essas espécies estão inseridas em duas subtribos, seis gêneros e sete espécies: Lutzomyiina - *Lu. longipalpis*, *Ev. cortelezzii*, *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940) e *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) e Psychodopygina: *Ny. whitmani* e *Pa. shannoni*.

As espécies capturadas com maior frequência através da armadilha de Shannon foram *Pa. shannoni* (54.2%) e *Pi. pessoai* (19.2%) (Tabela 2). Pode-se observar dois horários onde o número de insetos coletados foi maior, sendo estes: das 18:00 às 19:00 e das 20:00 às 21:00 (Tabela 2).

As fêmeas foram predominantes sobre os machos apenas entre os representantes de *Ny. whitmani* (62,5%) na proporção de 1,66:1, não apresentando significância estatística.

Tabela 2 – Flebotomíneos capturados mensalmente com a armadilha de Shannon instalada em área urbana da cidade de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil, de abril de 2009 a março de 2010, das 18:00 às 22:00

	18:00 às 19:00		19:00 às 20:00		20:00 às 21:00		21:00 às 22:00		Total			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	MF	%MF
<i>Ev. cortelezzii</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1.3
<i>Lu. longipalpis</i>	2	-	1	-	13	3	-	-	16	3	19	12.3
<i>Ny. whitmani</i>	-	3	-	4	5	3	1	-	6	10	16	10.3
<i>Pi. monticola</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1.3
<i>Pi. pessoai</i>	8	4	9	4	1	2	-	2	18	12	30	19.3
<i>Pa. shannoni</i>	35	3	15	5	18	4	4	-	72	12	84	54.2
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	2	1.3
Total	45	14	25	13	37	12	5	4	112	43	155	100
%	38,1		24,5		31,6		5,8					

M = macho; F = fêmea; *Ev.*= *Evandromyia*; *Lu.*=*Lutzomyia*; *Ny.*= *Nyssomyia*; *Pi.*= *Pintomyia*; *Pa.*= *Psathyromyia*; *Sc.*=*Sciopemyia*

Dentre as espécies coletadas, *Lu. longipalpis* foi a mais abundante, apresentando um índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) = 0,86 (Tabela 3).

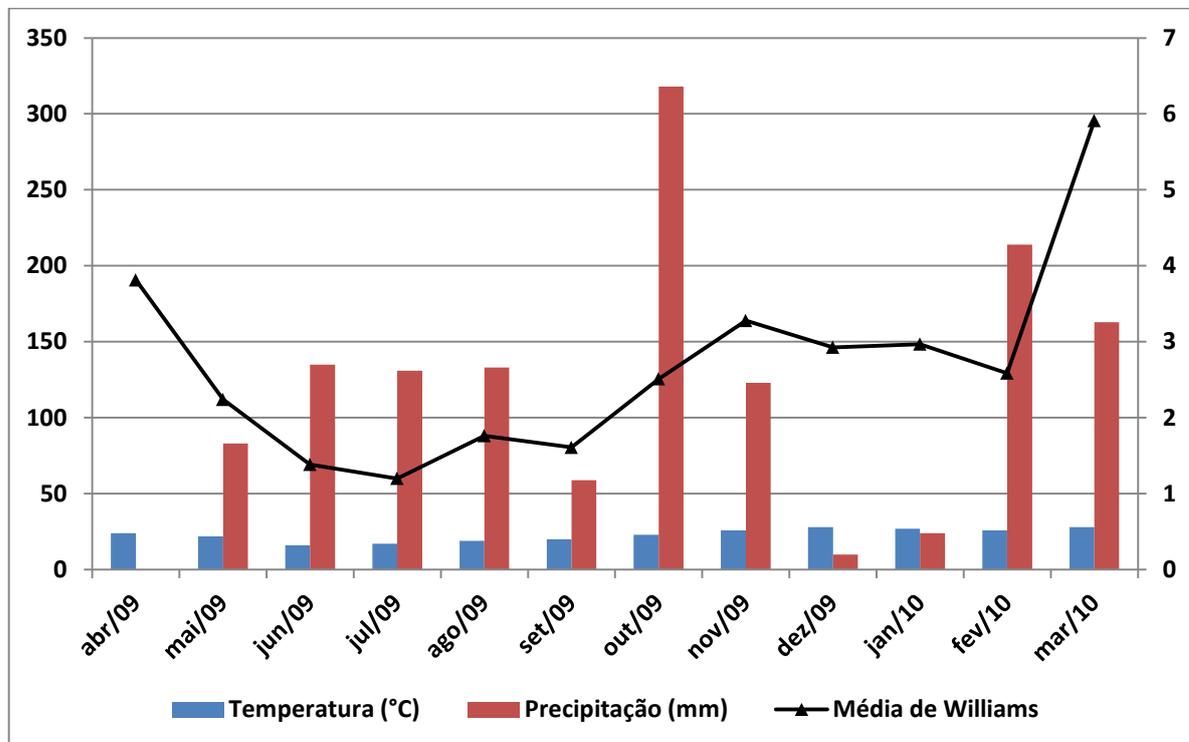
Tabela 3 – Índice de Abundância das Espécies Padronizado (IAEP) segundo espécies de flebotomíneos capturadas com armadilhas automáticas luminosas modificadas modelo CDC, Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil, de abril de 2009 a março de 2010

Espécies	IAEP	Posição
<i>Lu. longipalpis</i>	0.86	1º
<i>Ny. whitmani</i>	0.11	2º
<i>Pa. shannoni</i>	0.07	3º
<i>Ev. cortelezzii</i>	0.07	3º
<i>Br. brumpti</i>	0.02	4º

*Lu.*=*Lutzomyia*; *Ny.*= *Nyssomyia*; *Pa.*= *Psathyromyia*; *Ev.*= *Evandromyia*; *Br.* = *Brumptomyia*.

A média geométrica de Williams foi utilizada para quantificar a frequência e regularidade da espécie mais abundante coletada através da armadilha CDC. A espécie *Lu. Longipalpis* teve seu pico nos meses de novembro de 2009 e março de 2010, após os períodos com maiores índices de precipitação, como pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 - Temperatura média mensal (°C), precipitação mensal (mm) e frequência mensal (média de Williams, MW) de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados em 14 ecótopos de Ponta Porã, MS, Brasil, de abril de 2009 a março de 2010

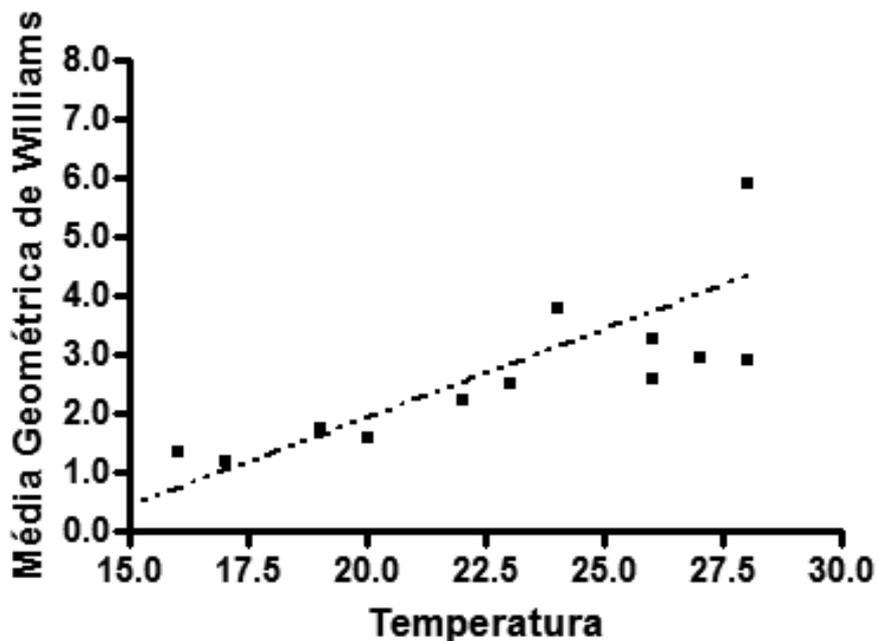


Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CEPETEC-INMET), 2010.

Não foram observadas correlações entre precipitação mensal e Média Geométrica de Williams, e entre temperatura e precipitação mensal.

A correlação entre as variáveis de precipitação e a frequência e regularidade de *Lu. longipalpis* ao longo dos meses de captura não apresentou significância estatística. Apesar desse resultado, ficou evidente a tendência da espécie em ser mais abundante após os períodos chuvosos. Houve correlação positiva e significativa ( $r = 0,7755$ ,  $p = 0,003$ ) entre a temperatura e a Média Geométrica de Williams como pode ser visualizado na figura 9.

Figura 9 - Diagrama de dispersão entre temperatura e média geométrica de Williams

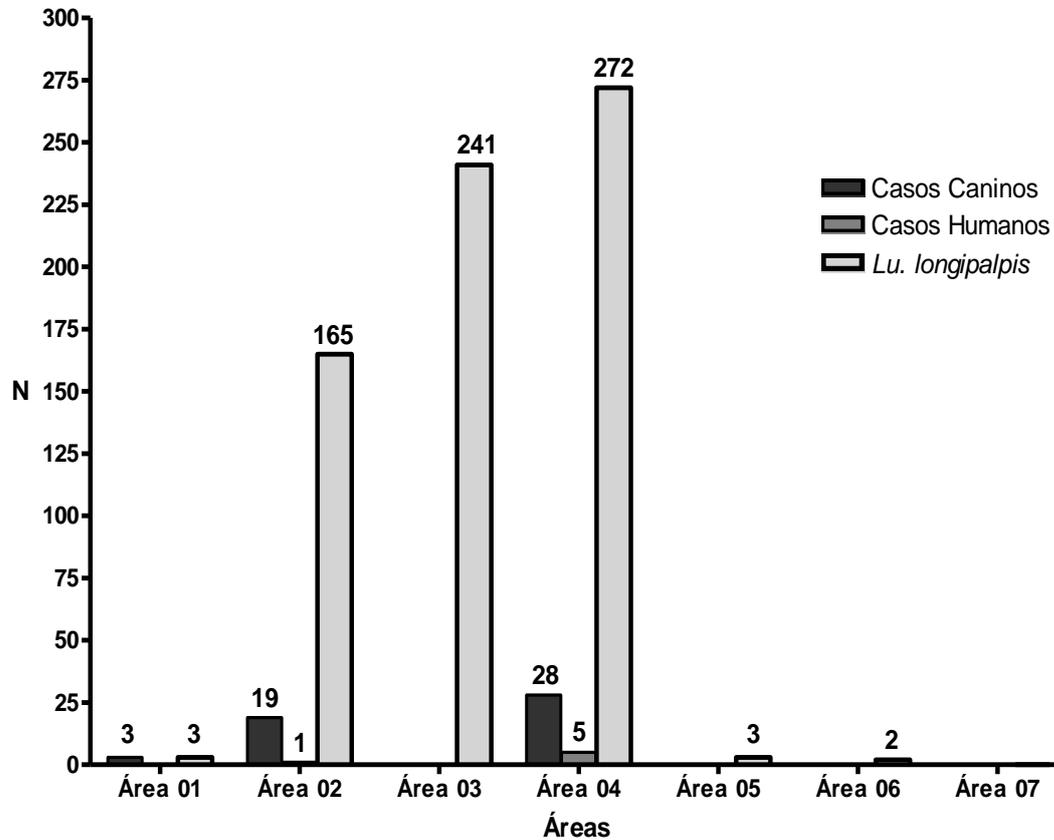


Nota: Observa-se na dispersão correlação positiva ( $r = 0,7755$ ,  $p = 0,003$ ) entre as variáveis.

Entre os meses de abril de 2009 e março de 2010 foram notificados seis casos de LVA e 50 casos de LVC na cidade de Ponta Porã. Esses casos ocorreram em apenas três das sete áreas estudadas.

Não foi observada correlação entre número de exemplares capturados e número de casos caninos ( $r = 0,6841$ ;  $p = 0,0901$ ), bem como entre o número de *Lu. longipalpis* e o número de casos humanos nas áreas de captura ( $r = 0,6761$ ;  $p = 0,0954$ ) (Figura 10).

Figura 10 - Frequência de aparecimento dos casos caninos, casos humanos e de *Lutzomyia longipalpis* segundo área estudada em zona urbana de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil, entre abril de 2009 e março de 2010.



Após a dissecação das fêmeas coletadas em armadilha de Shannon, apenas um exemplar de *Ev. cortelezzii* apresentou formas flageladas no conteúdo digestivo (Figura 11).

Figura 11 – Flagelados observados durante a dissecação do trato digestório de fêmea de *Evandromyia cortelezzii* capturada em área urbana do município de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul

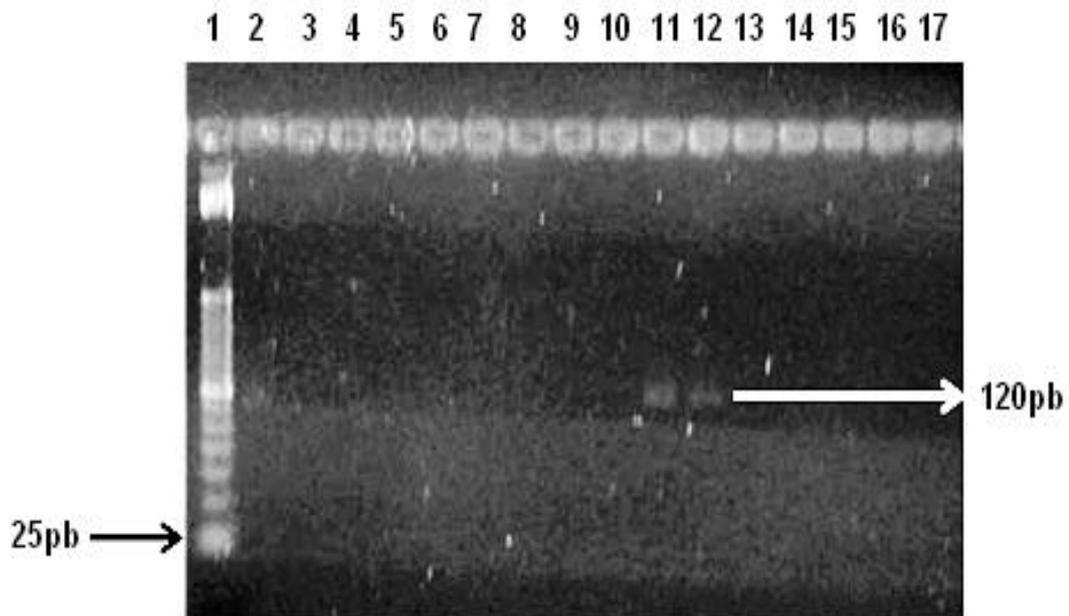


Fonte: Dorval (2010)

Para análise molecular, todas as fêmeas capturadas em ambas armadilhas foram dispostas em 107 grupos, sendo que cada grupo continha de um a seis exemplares.

O fragmento de 120 pb característico de *Leishmania* sp foi observado em um dos 107 grupos dessas amostras (Figura 12), sendo este composto por uma fêmea da espécie *Ev. cortelezzii* capturada através de coleta manual na armadilha de Shannon.

Figura 12 - Resultado da amplificação do teste de extração de DNA em flebotomíneos utilizando os iniciadores 13A e 13B - A (5'- TCT TGC GGG GAG GGG GTG - 3') e B (5'- TTG ACC CCC AAC CAC ATT TTA - 3'), descritos por Rodgers *et al.* (1990) para o gênero *Leishmania*. 1, marcador molecular de 25 pb; 2 ao 10 amostras negativas; 11, amostra positiva (*Evandromyia cortellezzii*); 12, controle positivo; 13 controle negativo, 14 a 15 amostras negativas



A PCR foi realizada para as 107 amostras e após o resultado do produto da amplificação através da Eletroforese em gel de Agarose, foi feita a repetição da PCR para região ITS-1 (região ribossômica intergênica) de acordo com as especificações do fabricante.

A amostra positiva teve 100% de identidade com a *Leishmania (L.) infantum chagasi* pelo alinhamento no programa nucleotideblast (Blastn) (ACCESSION GU045591) (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de fêmeas coletadas através de armadilhas luminosas e armadilha de Shannon e percentual das espécies capturadas em área urbana de Ponta Pora, Mato Grosso do Sul, Brasil entre abril de 2009 e março de 2010

Especies	No. de fêmeas	%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	1	0,54
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	7	3,78
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	132	71,35
<i>Nyssomyia whitmani</i>	14	7,57
<i>Psathyromyia shannoni</i>	15	8,11
<i>Pintomyia monticola</i>	2	1,08
<i>Pintomyia pessoai</i>	12	6,49
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	1,08
TOTAL	185	100%

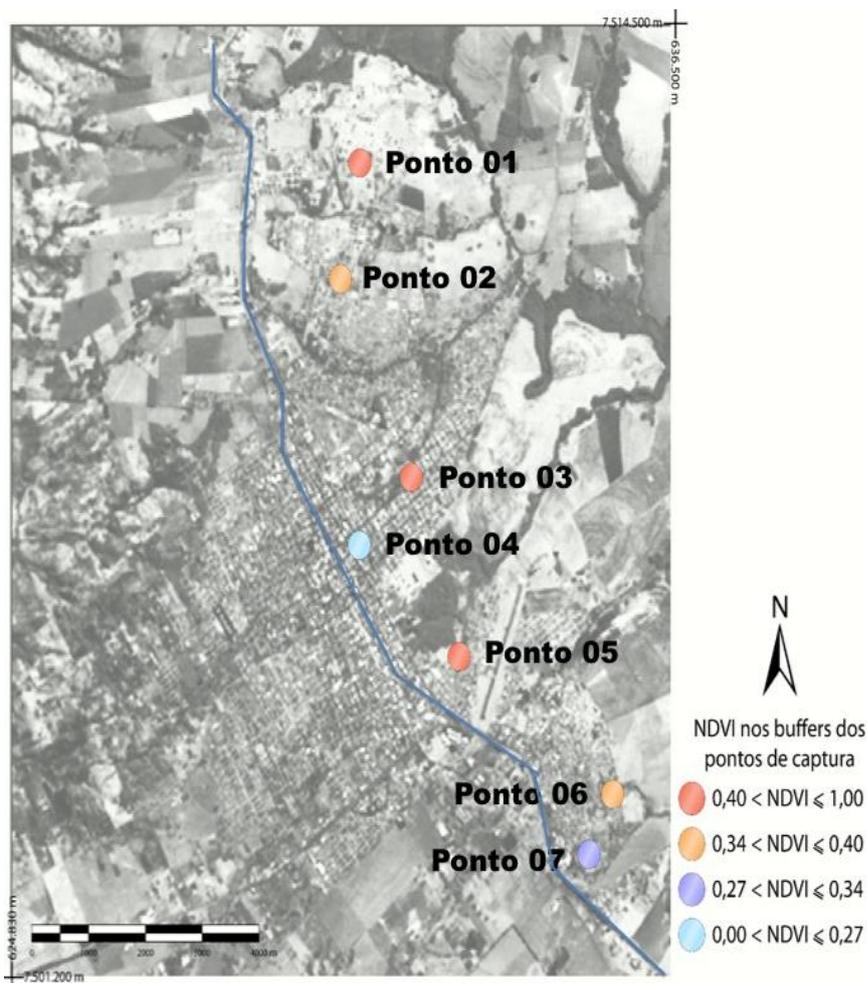
Os valores referentes ao índice de vegetação pela diferença normalizada (NDVI) dos sete pontos de captura podem ser observados na Figura 13.

Na figura estão delimitados os sete pontos de coleta em Ponta Porã, cada qual inserido dentro de uma área, buscando avaliar toda a região urbana.

A linha azul reforça a visualização da fronteira seca entre os dois países, Brasil e Paraguai, sendo que ao lado esquerdo do mapa encontra-se a cidade de Pedro Juan Caballero e ao lado direito Ponta Porã.

Os maiores índices de vegetação (0,40 a 1,00) são observados nos pontos um, três e cinco, e o menor índice (0,00 a 0,27) no ponto quatro. O ponto três que mantém essa característica de vegetação de porte de mata está localizado em área central da cidade.

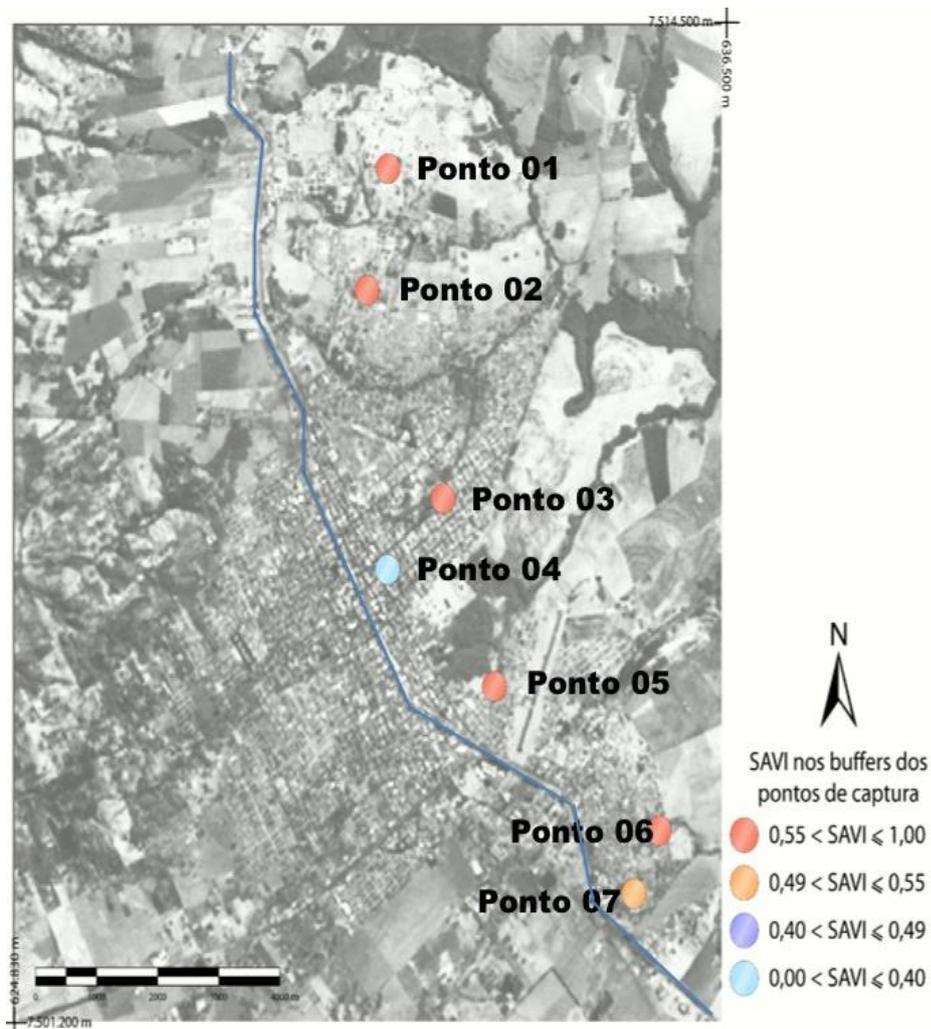
Figura 13 – Imagem Landsat com os índices de NDVI observados nos pontos de captura da área urbana de Ponta Porã, localizada ao lado direito no mapa. Quanto mais próximo de 1,00 o valor de NDVI, mais elevada é a quantidade de fitomassa. Os valores acima de 0,40 indicam a presença de vegetação do porte de mata. Abaixo de 0,27 a quantidade de vegetação no ambiente estudado é mínima. No ponto 3 observa-se índice elevado de vegetação, mesmo o ponto estando localizado em área central. O ponto 4 apresentou quantidade mínima de vegetação, local com concentração de vetores, de casos caninos e de casos humanos da doença



A correção desses valores nos diferentes pontos de captura foi feita através do índice de vegetação ajustado ao fundo do solo (SAVI), como pode ser visualizado na figura 14.

Com a utilização do SAVI, pode-se observar que os pontos dois e seis que apresentavam índices medianos de vegetação através da análise pelo NDVI (0,34 e 0,40), demonstraram na figura 13 valores elevados de vegetação que variam de 0,55 a 1,00.

Figura 14 - Imagem Landsat com os valores referentes ao SAVI que varia de 0,00 a 1,00 nos diferentes pontos de captura em área urbana de Ponta Porã, localizada do lado direito do mapa. Nota-se na figura, após a correção, valores elevados de vegetação em 5 dos 7 pontos estudados. No ponto 4 observa-se valor mínimo de vegetação corroborando com o que foi observado através do NDVI



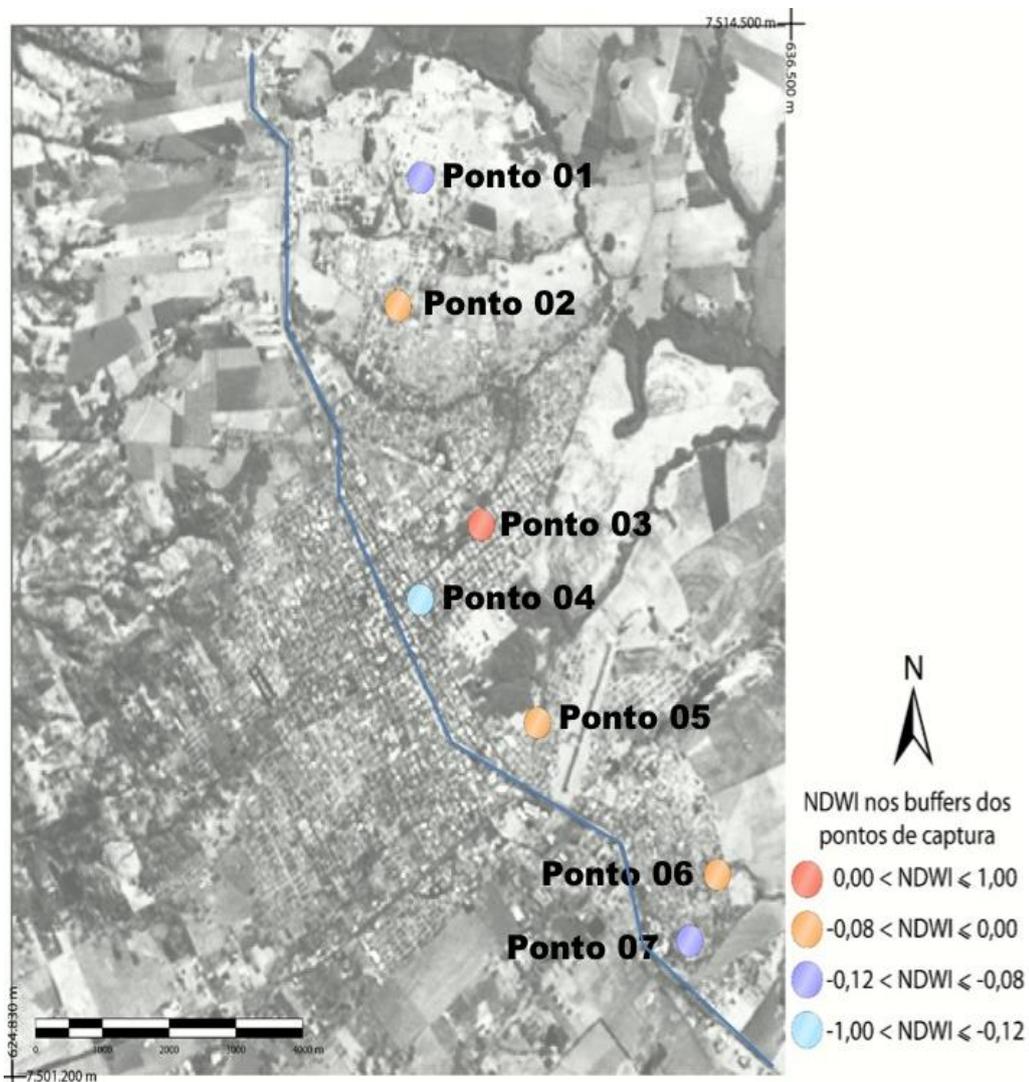
O ponto que apresentou valor de NDWI entre 0,00 e 1,00, que indica maior quantidade de água, foi o ponto três.

Nos pontos, dois, cinco e seis foram obtidos valores medianos de água, correspondente ao grau de umidade moderada na localidade.

No ponto quatro foram encontrados valores mínimos de vegetação e de umidade, através dos três índices (NDVI, SAVI e NDWI).

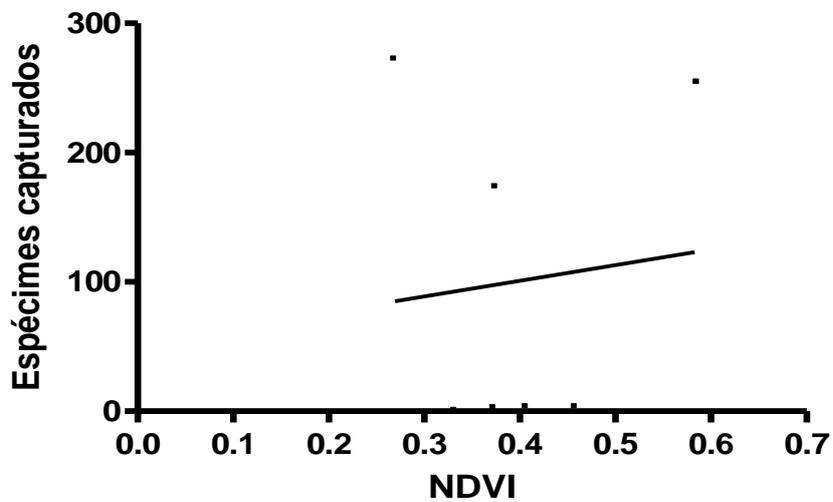
Neste local ocorreu a concentração de casos de LV canina e humana, além da captura de exemplares de *Lutzomyia longipalpis* como pode ser visualizado na figura 15.

Figura 15 - Imagem Landsat com os valores referentes ao índice de diferença normalizada pela água (NDWI) que varia de -1,00 a +1,00 nos pontos de captura da área urbana de Ponta Porã, localizada ao lado direito no mapa. Quando a variação do índice ocorre entre -0,12 e -1,00 há indicativo de quantidade mínima de água no ponto estudado. O Ponto 3, local onde foi encontrada a maior diversidade de espécies apresentou valor elevado para NDWI indicando presença de água em grande quantidade.



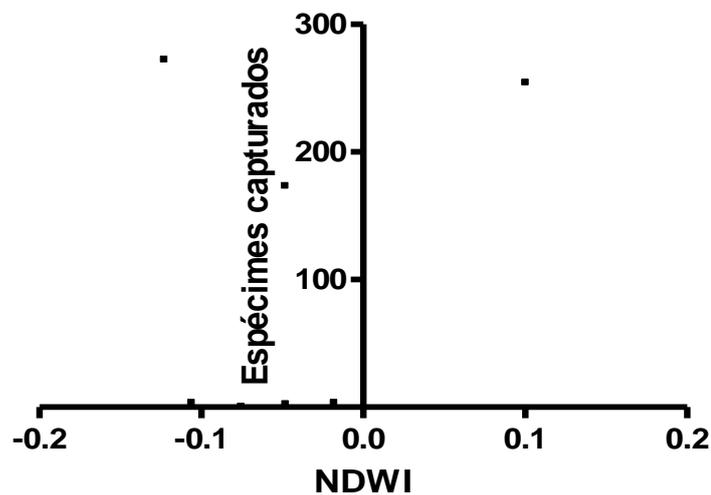
Na figura 16 é apresentada a relação entre o NDVI e o número de flebotomíneos capturados na área urbana de Ponta Porã. Nota-se a ausência de correlação entre as variáveis, ou seja, o valor do NDVI (sendo alto ou baixo) não interferiu no número de flebotomíneos capturados.

Figura 16 - Diagrama de dispersão entre NDVI e número de espécimes capturado



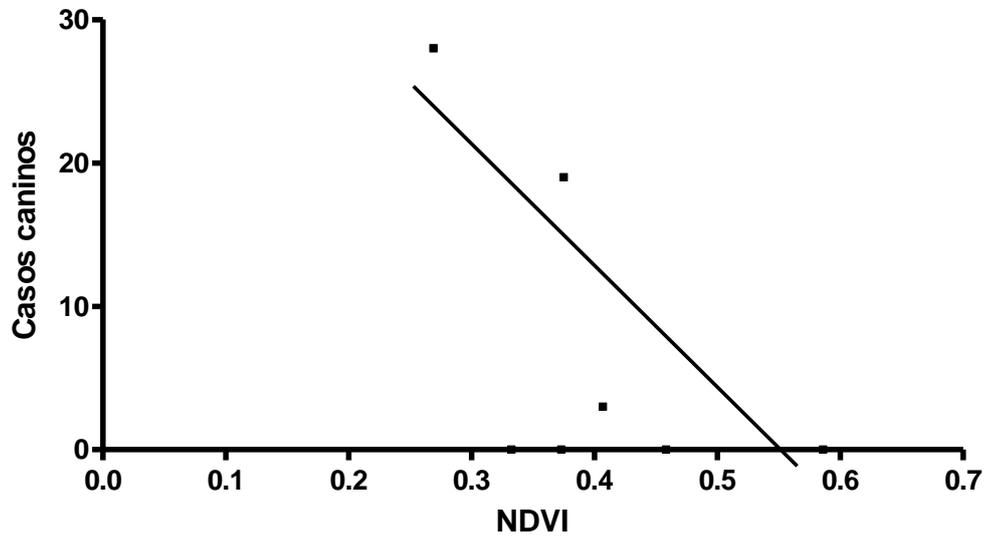
Na figura 17, pode-se observar a ausência de correlação entre o NDWI e o número de flebotomíneos capturados em área urbana.

Figura 17 - Diagrama de dispersão entre NDWI e número de espécimes capturados. Observa-se na dispersão ausência de correlação ( $r = 0,2730$ ;  $p = 0,5536$ ) entre as variáveis



Na figura 18 pode-se observar a correlação negativa entre o NDVI e o número de casos caninos, ou seja, quanto menor o valor de NDVI, maior o número de casos caninos existentes em Ponta Porã.

Figura 18 - Diagrama de dispersão entre NDVI e número de casos caninos. Observe-se na dispersão correlação negativa ( $r = -0,8729$ ;  $p = 0,1271$ ) entre as variáveis



## 6 DISCUSSÃO

O levantamento entomológico realizado com o intuito de se conhecer a fauna flebotomínea em regiões de fronteira, tem ocorrido há anos (LE PONT; DESJEUX, 1987). Quando a caracterização epidemiológica das leishmanioses ocorre em países fronteiriços tenta-se avaliar a possibilidade da migração de indivíduos e outros hospedeiros vertebrados infectados pelo parasita, das áreas endêmicas para áreas brasileiras.

Em Mato Grosso do Sul, estudos a respeito da dinâmica das leishmanioses foram realizados em outras regiões de fronteira com o Paraguai (ALMEIDA *et al.* 2010b). Em Antônio João foram registrados casos de LVA e LVC, além de ter sido capturado, dentre outras espécies, exemplares de *Ny. whitmani* (vetora da *L. (V.) braziliensis*) e de *Lu. longipalpis*, este último com representantes naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Em Bela Vista foi realizado estudo da fauna flebotomínea em área endêmica de LTA, sendo constatada a presença de vetores e agentes da LTA e LVA (DORVAL *et al.* 2010).

Ponta Porã é um município que constitui em área conurbada internacional fazendo fronteira seca com a cidade de Pedro Juan Caballero, capital do departamento de Amambay, no Paraguai (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

De acordo com as informações socioeconômicas oficiais de Ponta Porã (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011) nos anos recentes foram produzidos 16.558 m<sup>3</sup> de lenha, 31.974 m<sup>3</sup> de madeira em tora e 1.060 toneladas de carvão vegetal. Isto denota, claramente, a eliminação de áreas de vegetação natural o que pode favorecer a migração de vetores e conseqüentemente a urbanização da doença (COSTA *et al.*, 2007; RANGEL; LAINSON, 2009; RANGEL; VILELA, 2008).

Essa problemática motivou a realização da pesquisa que se iniciou com a caracterização da fauna flebotomínea em Ponta Porã. A utilização de armadilha luminosa modificada do tipo CDC e da armadilha de Shannon deveu-se ao fato de que o uso exclusivo da CDC em área urbana não possibilita a identificação da fauna flebotomínea em seus aspectos qualitativo e quantitativo (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

No presente trabalho observou-se o predomínio do percentual de machos sobre as fêmeas em todas as etapas do estudo, tanto nas capturas através das armadilhas luminosas quanto através das capturas com armadilha de Shannon.

Esses dados corroboram com estudos realizados utilizando armadilhas luminosas modificadas em diferentes municípios de Mato Grosso do Sul, quais sejam: Campo Grande (OLIVEIRA A.G. O. *et al.*, 2006; SILVA, ANDREOTTI, HONNER, 2007; SILVA *et al.*, 2008), em Três Lagoas (OLIVEIRA, G. M. G. *et al.*, 2010), em Bonito (NUNES *et al.*, 2008) e em Ponta Porã (ALMEIDA *et al.*, 2010b).

O levantamento realizado em Ponta Porã sugere que a dinâmica das populações das espécies estudadas é similar a observada por Barretto (1943) e Aguiar *et al.* (1985) em estudos nos quais verificou-se que as capturas com armadilhas luminosas têm a vantagem de oferecer um número maior de machos.

Como possíveis hipóteses, há também o fato da eclosão dos machos ocorrer antes da eclosão das fêmeas ou a proximidade das armadilhas instaladas com os criadouros. O fato de existirem animais domésticos no peridomicílio também leva à possibilidade de que os machos estejam sendo atraídos pelos cairomônios liberados pelos hospedeiros vertebrados existentes nos ecótopos (cães, galinhas, homem). Pode ter havido atração às armadilhas quando do acompanhamento às fêmeas para a cópula, pois sabe-se que machos de flebotomíneos formam agregados “lekking” com o propósito de acasalamento (KELYY; DYE, 1997; FELICIANGELI, 1987).

No município de Ponta Porã, encontram-se ambientes característicos e propícios à urbanização da LVA, visto que foram observados, na maior parte dos pontos de coleta, acúmulo de matéria orgânica no entorno das residências e a presença de diversas espécies de animais no peridomicílio, dentre elas cães e aves. Essa situação assemelha-se à observada por Bigeli, Oliveira-Júnior e Teles (2012) em Palmas, estado do Tocantins, onde foram encontrados acúmulo de matéria orgânica e criação de cães soltos e galinhas nas residências.

Dentre as espécies coletadas em área urbana, pôde-se observar maior índice de captura no intradomicílio (61,5%) das residências. A maior parte desses exemplares capturados através de armadilhas luminosas pertence à espécie *Lu. longipalpis*.

A presença de *Lu. longipalpis* em área intradomiciliar foi observada em cidades do estado de São Paulo, como descrito por Costa *et al.* (1997) em Araçatuba, cidade com elevados índices de LVC e LVA, e Rangel e colaboradores

(2012) em Dracena, onde o ambiente em que ocorreram as capturas apresentou características favoráveis para a manutenção de exemplares fora e dentro das residências. Andrade-Filho e Brazil (2009) observaram baixos índices de *Lu. longipalpis* em área peridomiciliar no Estado de Alagoas.

Em levantamento entomológico realizado em Ponta Porã (ALMEIDA *et al.*, 2010b) foram encontrados mais exemplares em peridomicílio, dado discordante do achado no presente estudo. Essa situação também foi descrita em outros estudos realizado em Mato Grosso do Sul que destacaram maior número de fêmeas de *Lu. longipalpis* em ambiente peridomiciliar (NUNES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SILVA; ANDREOTTI; HONNER, 2007). Em estudo realizado no Panamá, Valderrama, Tavares e Andrade-Filho (2011) também observaram o encontro dessa espécie em ambientes peridomiciliares.

Há a hipótese que *Lu. longipalpis* possa estar utilizando o acúmulo de matéria orgânica presente no peridomicílio como fonte de alimento para as larvas (AGUIAR; MEDEIROS, 1996), mas seu encontro no intradomicílio sugere a adaptação da mesma aos ambientes artificiais criados pelo homem, que servem de abrigo para as formas adultas (RANGEL; VILELA, 2008). Considera-se também como fator importante, a presença de cães no interior das residências estudadas, já que os mesmos podem atuar como fonte de alimento para as fêmeas, servindo como possíveis reservatórios da doença (BIGELI; OLIVEIRA-JÚNIOR; TELES, 2012).

Com base em estudos realizados em diferentes estados brasileiros, pode-se inferir que *Lu. longipalpis* está bem adaptada, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste, às periferias de grandes centros e aos ambientes urbanos (CUTOLO; CAMARGO; ZUBEN, 2009; PAULA *et al.*, 2008; RANGEL; VILELA, 2008; SILVA; ANDREOTTI; HONNER, 2007). Esse contexto denota o ecletismo da espécie e a facilidade da mesma em se instalar em diferentes locais com características ambientais distintas, como observado por Brazil e colaboradores ao coletarem exemplares em área litorânea do Rio de Janeiro (BRAZIL *et al.*, 2012).

*Lu. longipalpis* foi a espécie mais frequente dentre as capturadas com armadilhas CDC no presente estudo. Almeida *et al.* (2010b) já haviam descrito situação semelhante na região nos anos anteriores. Em Assunción, Paraguai, Brazil e colaboradores (2009) observaram essa constância ao coletar exemplares de *Lu. longipalpis* em área central.

Essa espécie sempre foi encontrada em áreas de floresta úmida nas regiões do Panamá e Equador. No Brasil pode ser encontrada em áreas com elevados índices de vegetação e em áreas completamente antropizadas, demonstrando assim uma boa adaptação a ambientes rurais e urbanos nas diferentes localidades nos países da América Latina (BEJARANO *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; VALDERRAMA; TAVARES; ANDRADE-FILHO, 2011; VIVERO *et al.*, 2009).

Dentre os municípios de Mato Grosso do Sul, Oliveira G. M. G. *et al.* (2010) também descreveram a espécie como a mais frequente na cidade de Três Lagoas, local que se destacou-se pelo aumento de casos de LVA, situação observada também em outros estudos realizados em Campo Grande e em Bonito (ANDRADE *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2008; OLIVEIRA, A. G. *et al.*, 2006; SILVA; ANDREOTTI; HONNER, 2007). Situação similar foi encontrada em estudo de abrangência geral realizado em Mato Grosso do Sul (ALMEIDA *et al.*, 2010a).

*Ny. whitmani* foi a segunda espécie mais frequente encontrada através das capturas com armadilhas automáticas luminosas modificadas. Sabe-se que esta espécie é bem conhecida pela sua antropofilia e envolvimento na transmissão de LTA no Brasil e no Paraguai, já que pode albergar a *L. (V.) braziliensis*, podendo ser encontrada no intradomicílio e peridomicílio nas diferentes regiões (DONALISIO *et al.*, 2012; GALATI *et al.* 1996; RANGEL; LAINSON, 2009).

A presença de exemplares dessa espécie que era restrita a áreas endêmicas de LTA, atualmente apresenta ampla distribuição geográfica indicando adaptação aos diferentes nichos ecológicos e acarretando mudanças comportamentais nas diferentes populações, inclusive em outros países (ANDRADE *et al.*, 2005; BEJARANO *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2007; RANGEL; LAINSON, 2009).

Corroborando com o que foi encontrado em Ponta Porã, estudos vêm relatando a frequência do encontro de exemplares da espécie em áreas urbanas, em região peridomiciliar. Esses registros ocorreram nos estados de Pernambuco e Minas Gerais (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2007; DONALISIO *et al.*, 2012).

Em Mato Grosso do Sul *Ny. whitmani* já foi encontrada em regiões consideradas de mata, como Pantanal sul-matogrossense e Serra da Bodoquena e em áreas urbanizadas como a capital do estado, Campo Grande (ANDRADE *et al.*,

2009; BRAGA-MIRANDA, MIRANDA, GALATI, 2006; GALATI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O encontro da espécie em área urbana sugere que a mesma pode carrear *Leishmania* spp. de um ciclo zoonótico para o peridomiciliar, já que o encontro de espécimes naturalmente infectadas tem sido observado em outros estados brasileiros (CUTOLO, CAMARGO, ZUBEN, 2009).

Para o estudo da diversidade das espécies foi utilizado o índice de Shannon (H). Neste trabalho o índice foi utilizado para calcular a relação entre o número de espécies e o número de indivíduos capturados em um determinado ecótopo.

O índice de diversidade das espécies de flebotomíneos variou de  $H=0$  a  $H=0,24$  nos diferentes ecótopos. No Ponto 2 o valor mais elevado ocorreu no intradomicílio e no Ponto 3 o valor mais elevado ocorreu no peridomicílio. Os dois pontos de captura supracitados estão localizados na área central da cidade.

O Ponto 2 apresentava resquícios de vegetação e acúmulo de matéria orgânica no entorno da residência, o que denota contexto ambiental descuidado no tocante à limpeza de quintais e abrigos de animais domésticos. As características do ambiente e a proximidade dos abrigos com a residência favorece o encontro de vetores no interior da residência.

O Ponto 3 encontra-se em terreno onde existe uma Pousada que recebe grande fluxo de turistas durante o ano. Como característica verificou-se a manutenção da vegetação nativa no entorno do terreno e, por conseguinte, no entorno das três casas que foram construídas na localidade.

Neste ponto de captura, o galinheiro encontrava-se cerca de 20 metros de uma porção de vegetação nativa; sendo assim a diversidade de espécies observadas nesse ecótopo pode estar relacionada com a elevada atratividade que espécies de flebotomíneos como *Lu. longipalpis* demonstram por galinhas (ALEXANDER *et al.*, 2002; FÉRNANDEZ *et al.*, 2010; LAINSON; RANGEL, 2005; REINHOLD-CASTRO *et al.*, 2008) e à presença de animais domésticos acompanhados de condições de higiene precárias que foram observados na localidade. Esse tipo de ambiente favorável para atração desses vetores foi observado por outros autores em diferentes regiões brasileiras (CORTADA *et al.*, 2004; TEODORO *et al.*, 1993; XIMENES; SOUZA; CASTELLÓN, 1999).

Por outro lado o galinheiro pode estar atuando como barreira zooprofilática, diminuindo a população de flebotomíneos no intradomicílio do Ponto 3. Esse tipo de

comportamento do vetor foi observado também por Costa (2011) em Passira, Pernambuco onde se observou uma quantidade significativa dos mesmos nos galinheiros, enquanto que no interior das casas foram encontrados em menor número.

A riqueza de espécies é favorecida pela proximidade da residência com a área de mata, fato já observado em estudos realizados em Bonito e Campo Grande (ANDRADE *et al.*, 2009; OLIVEIRA, A. G. *et al.* 2006) e no estado do Paraná por Teodoro *et al.* (2006). Os dados de Ponta Porã também corroboram com os achados de Legriffon *et al.* (2012) que coletaram exemplares de diferentes espécies em maior quantidade no peridomicílio em região do Paraná.

Amaral e colaboradores (2011) observaram situação diferente em Mato Grosso, onde houve menor diversidade de espécies em área de mata e maior diversidade em área residencial, considerada urbanizada.

A riqueza de espécies é muito dependente do tamanho da amostra, ou seja, quanto maior a amostra, mais elevado o número de espécies que poderão ser encontradas. A riqueza de espécies diz pouco a respeito da organização da comunidade, enquanto que a equitabilidade expressa a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre as diferentes espécies e permite avaliar se possuem abundância semelhante ou divergente (HAYEK; BUZAS, 1997).

O índice de Pielou (J) foi utilizado para avaliar a proporção com que cada espécie contribuiu na comunidade dos diferentes ecótopos. Quando apenas uma espécie ou poucas delas são dominantes, o valor de J é baixo. Como houve somente a captura da espécie *Lu. longipalpis* em quatro dos sete pontos estudados, sendo o valor de  $J=0$ , pode-se verificar a predominância da mesma nos diferentes ecótopos (HAYEK; BUZAS, 1997).

A predominância de *Lu. longipalpis* em relação as outras espécies de flebotomíneos já havia sido verificada em Ponta Porã por Almeida *et al.* (2010b), 2008).

Paula *et al.* (2008) verificaram situação semelhante ao coletar apenas representantes de *Lu. longipalpis* em inquérito realizado em Uberlândia, fato observado também por Silva *et al.* (2008) e Oliveira, A. G. e colaboradores (2006) que relataram a presença quase que exclusiva de exemplares dessa espécie em área urbana de Campo Grande, corroborando com o encontrado no presente estudo. O ecletismo da espécie frente ao meio em que habita (BRAZIL *et al.*, 2012)

e às fontes de alimento (hospedeiros vertebrados), pode sugerir o porquê da predominância da mesma sobre as outras espécies encontradas no ambiente estudado.

Rápidas mudanças nas condições ambientais em diversas regiões tropicais, associadas aos processos de desmatamento e urbanização podem explicar a mudança no padrão da espécie frente a possíveis abrigos e a fontes alimentares (FERNÁNDES *et al.*, 2010; RANGEL; VILELA, 2008).

Apesar da baixa densidade de vetores capturados com armadilha de Shannon quando comparados com a armadilha CDC, os resultados obtidos complementam informações referentes à fauna flebotomínea na área de estudo, uma vez que esta metodologia foi utilizada pela primeira vez em trabalho realizado na cidade.

Foram observados dois picos de captura, das 18:00 às 19:00 (38,1%) e das 20:00 às 21:00 (31,6%). Dorval *et al.* (2009) observaram situação semelhante em Bela Vista quando a maior parte dos vetores foi capturada das 18:00 às 21:00 horas e na Serra da Bodoquena onde Galati *et al.* (2006) coletaram maior número de exemplares no período compreendido entre as 18:00 e 19:00 horas.

As capturas efetuadas através da armadilha de Shannon servem para verificar a antropofilia das espécies presentes em um determinado ecótopo. No presente estudo foram capturados mais exemplares machos (72,3%) do que fêmeas.

A elevada taxa de machos capturados no Ponto 3, (local onde foi instalada a armadilha de Shannon) sugere que o mesmo apresente no ecótopo um comportamento de “*lekking*” dos machos como sugerido por Alexander e Young (1992).

O local onde foi montada a armadilha tem como característica a presença de vegetação nativa e a proximidade de uma nascente de água. Essas características propiciam a manutenção da umidade local, tornando o ambiente favorável para a criação das espécies, servindo como fonte de abrigo para as mesmas em sua forma larval e alada.

O *lekking* ocorre quando os flebotomíneos machos são atraídos por odores e estímulos químicos (caïromônios) que o hospedeiro produz. Quando os machos se estabelecem no local liberam feromônios para atrair as fêmeas visando o acasalamento e conseqüentemente, acabam atraindo outros machos. Deste modo, ocorre a concentração dos mesmos no local onde se encontram os hospedeiros para que assim ocorra o cortejo e a cópula (QUINNEL; DYE, 1994).

Flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* formam *leks* noturnos complexos, sobre ou perto de hospedeiros vertebrados (QUINNEL ; DYE, 1994). De acordo com Jones e Quinnel (2002) o número *per capita* de fêmeas decresce de acordo com o tamanho do *lekking* formado.

Outra hipótese é que durante as coletas com a armadilha de Shannon, a formação deste tipo de agregado de machos permite que sejam capturados com maior facilidade e rapidez, impedindo pela limitação de tempo, a liberação de feromônios que poderiam atrair as fêmeas para o local.

Vale ressaltar que as capturas através da armadilha de Shannon são manuais e durante a coleta o homem serve de isca, visto que as fêmeas são hematófagas e necessitam do sangue para a maturação dos ovos (SHERLOCK, 2003).

A liberação de odores pelos hospedeiros vivos pode ser responsável pela manutenção dos espécimes em locais onde se encontram as possíveis fontes alimento para as fêmeas (GIBSON; TORR, 1999).

O encontro de maior número de machos não corrobora com o que foi encontrado em estudos realizados com esta metodologia em outras localidades de Mato Grosso do Sul. Em Bonito, Bela Vista e em coletas efetuadas em grutas da Serra da Bodoquena (NUNES *et al.* 2008; DORVAL *et al.* 2009, GALATI *et al.*, 2001) foram coletadas mais fêmeas do que machos, fato também observado em Minas Gerais (CARVALHO *et al.*, 2008) e no Paraná (NEITZKE *et al.*, 2008). Esses resultados são justificados pelo hábito de hematofagia das fêmeas, que são atraídas pelos hospedeiros presentes no ambiente.

A maior frequência de exemplares capturados na armadilha de Shannon pertence à espécie *Pa. shannoni*, como já relatado por Dorval *et al.* (2009) em Bela Vista. Seu encontro não deve ser ignorado, considerando que diversos estudos mencionam exemplares desta espécie picando o homem e por já terem sido encontrados naturalmente infectados por protozoários do gênero *Leishmania*, indicando o potencial vetorial desses dípteros em ambientes naturais e antrópicos (ANDRADE-FILHO; GALATI; FALCÃO, 2007; GALATI *et al.*, 1996; NEITZKE *et al.*, 2008; PITA-PEREIRA *et al.*, 2005) .

Em Mato Grosso do Sul, a importância epidemiológica de *Pa. shannoni* foi mencionada em estudos desenvolvidos por Oliveira *et al.* (2003), Galati *et al.* (1996, 2006), Nunes *et al.* (2008) e Dorval *et al.* (2009).

*Pi. pessoai* foi a segunda espécie com maior número de exemplares capturados. Ressalta-se a importância da mesma pelo fato de já ter sido encontrada naturalmente infectada por protozoários do gênero *Leishmania* e por ser considerada importante vetora de agentes da LTA em território paulista. A adaptação a ambientes modificados tem sido observada em algumas regiões do Brasil, como São Paulo e Paraná (CUTOLO; CAMARGO; ZUBEN, 2009; LEGRIFON *et al.*, 2012).

As fêmeas da espécie *Ny. whitmani* se sobressaíram sobre os machos durante as capturas através da armadilha de Shannon, o que corrobora com outros estudos que confirmam a sua elevada antropofilia (GALATI *et al.*, 2001, MUNIZ *et al.*, 2006, RANGEL; LAINSON, 2009). O encontro dessa espécie no Ponto 3 está de acordo com os achados de Legriffon *et al.* (2012), que observaram exemplares em área urbana com presença de mata nativa nas proximidades.

A análise da abundância das espécies constitui-se em outro objetivo do presente estudo. Dentre as espécies capturadas através de armadilhas luminosas na área urbana, *Lu. longipalpis* foi a mais abundante, situação já observada por Almeida *et al.* (2010b) na região nos anos anteriores.

Oliveira A. G. *et al.* (2006) descreveram situação semelhante em Campo Grande e em Três Lagoas, os achados de Oliveira, G. M. G. *et al.* (2010) corroboram com o que foi descrito em Ponta Porã. Vale ressaltar o fato dos dois municípios supracitados apresentarem os maiores índices de casos de LVA e LVC notificados no estado (MATO GROSSO DO SUL, 2012). A abundância de *Lu. longipalpis* também foi observada em diferentes regiões do Brasil como Sudeste e Nordeste (ÁMORA *et al.*, 2010; CUTOLO *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os resultados encontrados em Ponta Porã são, portanto, concordantes com os da literatura (LAINSON; RANGEL, 2003; LAINSON; SHAW, 2005) no que diz respeito à abundância e a ampliação da distribuição geográfica do *Lu. longipalpis*, assim como da LVA no Brasil, provavelmente, como consequência direta das modificações dos ecossistemas provocadas pela ação predatória do homem. Isso tem levado à dispersão e à adaptação dos reservatórios naturais do parasita e, provavelmente, à criação de ecótopos adequados à proliferação do vetor, em ambiente antrópico (LAINSON; SHAW, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2008; RANGEL *et al.*, 2012; RANGEL; VILELA, 2008; SARAIVA, *et al.*, 2010).

Neste estudo os flebotomíneos capturados através de armadilhas luminosas modificadas tipo CDC mostraram-se presentes em todos os meses, inclusive nos meses com temperaturas mais baixas onde foram capturados em menor número. Legrifon *et al.* (2012) no Paraná, Nunes *et al.* (2008) em Bonito e Silva, Andreeotti e Honner (2007) em Campo Grande, encontraram situação similar.

Ao estudar a regularidade da espécie mais abundante, embora não tenham sido verificados valores estatisticamente significativos entre a Média de Williams (frequência mensal de *Lu. longipalpis* nos 14 ecótopos) e a precipitação pluviométrica, o gráfico de flutuação possibilita a verificação de valores crescentes após os períodos chuvosos, reforçando a hipótese de que a elevação da umidade do ambiente, em decorrência das chuvas, tem como consequência a emergência de formas aladas (FORATTINI, 1973).

Dados semelhantes foram obtidos em estudos realizados em diversos estados do Brasil, tais como: Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Paraná (ALMEIDA *et al.*, 2010b; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SILVA; ANDREOTTI; HONNER, 2007; COSTA, 2011; REBÊLO 2001; MICHALSKY *et al.*, 2009; RESENDE *et al.*, 2006; LEGRIFON *et al.*, 2012).

Pode-se observar, no presente estudo, a correlação positiva entre a frequência anual de *Lu. longipalpis* e temperatura, ou seja, quanto mais elevada a temperatura, maior o número de exemplares capturados. Em condição térmica acima da considerada ótima para a maioria das espécies neotropicais (25° C- 27°C), o desenvolvimento do ciclo é mais rápido (BRAZIL; BRAZIL, 2003), sendo assim justifica-se o encontro de formas aladas em número elevado concomitante com o aumento da temperatura na região.

Em Três Lagoas Oliveira G. M. G *et al.* (2010) observaram que o número absoluto de *Lu. longipalpis* foi maior logo após os períodos nos quais ocorreu combinação de temperaturas médias mais altas e precipitação de chuvas de forma mais regular.

Contrariamente ao encontrado no presente estudo, Ámora e colaboradores (2010) descreveram em Fortaleza, o efeito negativo das altas temperaturas sobre a densidade de *Lu. longipalpis* e a não influência de precipitação e umidade na população de vetores. Nunes *et al.* (2008) encontraram ausência de correlação entre a temperatura e a média de Williams em Bonito.

A análise da correlação de *Lu. longipalpis* com os casos caninos e casos humanos de leishmaniose, constitui-se no terceiro objetivo deste estudo.

Todos os casos notificados de LVA e LVC durante o período de captura ocorreram em três das sete áreas estudadas: Área 1, onde está inserido o bairro Jardim Ivone, Área 2, onde está inserido o bairro Jardim das Paineiras e Área 4 local onde encontra-se o bairro São João, sendo que nesta última área houve a concentração dos casos.

Este bairro está localizado próximo à região central da cidade e o encontro dos casos em área urbana denota a expansão da LVA para ambientes antropizados, fato observado em outras regiões do Brasil. Essas modificações vêm acompanhando o crescimento de Ponta Porã o que somado à presença quase exclusiva de *Lu. longipalpis* na região, constitui-se em motivo de alerta para o surgimento de novos casos (CARNEIRO *et al.*, 2004; MISSAWA; LOROSA; DIAS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RANGEL; VILELA, 2008).

Os cães domésticos são considerados elementos fundamentais na cadeia de transmissão e disseminação da LVC, contribuindo para tal, fatores quais sejam: ser fonte de repasto para o vetor, atraindo-o assim para perto do homem; possuir intenso parasitismo cutâneo, mesmo na ausência de manifestações clínicas; e habitar o peridomicílio e também a própria moradia, apresentando estreita proximidade com o homem (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997). A presença de cães nas residências foi observada em todos os pontos de coleta, ressaltando que dos sete sítios de captura, apenas em um havia canil.

Pode-se considerar que os animais com altos títulos sorológicos e também sintomáticos possuem maior potencial de serem fontes de infecção para os flebotomíneos, visto que em muitos casos, além de possuírem parasitismo disseminado por vários órgãos, possuem também alta carga parasitária na pele (SILVA *et al.*, 2005).

Mesmo não havendo correlação estatística positiva entre os casos de LVA humana, casos de LVC e o número de *Lu. longipalpis* coletados, a presença de reservatórios em potencial e de vetores específicos para o agente na área urbana é importante na perspectiva da vigilância epidemiológica.

Considerando que os cães são os principais elos da cadeia epidemiológica da doença em área urbana, que houve o registro do primeiro caso de LVC em 2005 e a notificação do primeiro caso humano de LVA em 2007 e que nas áreas em que

ocorreram os casos foi coletado maior número de flebotomíneos, ações para o controle da doença tornam-se prioritárias (BIGELI; OLIVEIRA-JÚNIOR; TELES, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES, 2009; PRADO *et al.*, 2011, VIEIRA *et al.*, 2010).

A infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* também foi observada por Carvalho *et al.*, 2007 em estudo realizado em Santa Luzia, Minas Gerais, em exemplar da mesma espécie, corroborando com o que foi encontrado em Ponta Porã.

*Evandromyia cortelezzii* já havia sido coletada em cidades de Mato Grosso do Sul. Oliveira e colaboradores (2003) encontraram exemplares em Campo Grande, Almeida *et al.* (2010b) localizaram essa espécie no intra e peridomicílio de Ponta Porã (ALMEIDA *et al.*, 2010b) e o mesmo foi verificado em Antônio João por Nascimento *et al.* (2007). Vale ressaltar que nos três municípios supracitados ocorre a transmissão da LVA.

Em Ponta Porã foi encontrada uma fêmea de *Ev. cortelezzii* naturalmente infectada por *L. (L.) infantum chagasi*. Exemplares desse complexo já foram encontrados infectados por *L. (V.) braziliensis* (SARAIVA *et al.*, 2010), sugerindo assim a sua capacidade de albergar diferentes espécies de *Leishmania*.

Ainda que os requisitos de incriminação vetorial de *Evandromyia cortelezzii* não tenham sido atendidos, o aumento de sua frequência em peridomicílio e sua crescente antropofilia devem ser objeto de vigilância. A espécie vem sendo coletada com frequência em áreas de ocorrência de LVA, não só no Brasil, mas em outros países (ROSA *et al.*, 2010; SALÓMON; QUINTANA; ZAINDENBERG, 2008).

A adaptação gradativa aos ambientes antrópicos e as condições ambientais favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania* são fatores que evidenciam o potencial vetorial dessa espécie, ainda que mais estudos devam ser realizados em torno desta espécie como sugerido por Carvalho *et al.* (2007) e Saraiva *et al.* (2010).

Em trabalho desenvolvido por Neitzke *et al.* (2008) no Paraná, de 2.487 fêmeas estudadas apenas uma apresentou infecção natural por flagelados, corroborando com o achado em Ponta Porã onde apenas um exemplar, dentre os 107 grupos de amostra mostrou-se positivo para *Leishmania*.

Dentre as amostras do complexo *cortelezzii* analisadas por Saraiva *et al.* (2010), foi encontrado índice de 3,20% de positividade para *L. braziliensis*. Costa (2011) teve 0,15% de infecção em um *pool* de dez fêmeas de *Lu. longipalpis*.

De acordo com Michalsky *et al.* (2011) e Kato *et al.* (2005) a taxa de infecção de *Leishmania* no vetor é considerada baixa na natureza, mesmo em áreas endêmicas para LVA, mas baseado na capacidade vetorial pode-se sugerir que estudos a respeito de espécies suspeitas de transmissão sejam continuamente realizados.

A taxa mínima de infecção natural para Ponta Porã ficou em 0,54%. A variação no valor da taxa mínima de infecção ocorre de acordo com a quantidade de flebotomíneos positivos capturados. Em estudo desenvolvido por Michalsky *et al.* (2011) a taxa mínima de infecção encontrada foi de 3,9% para *Leishmania (L.) infantum chagasi*, já a taxa mínima de infecção encontrado por Soares *et al.* (2010) foi de 0,25% e por Oliveira-Pereira e colaboradores (2006) de 0,4%.

Trabalhos utilizando ferramentas como a PCR têm sido realizados com o intuito de oferecer respostas mais precisas quanto à epidemiologia das leishmanioses, agindo na identificação de reservatórios animais e detectando parasitas nos vetores (OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006).

Em Mato Grosso do Sul outras pesquisas utilizaram a biologia molecular como ferramenta no estudo da epidemiologia das leishmanioses. Lima-Júnior *et al.*, (2009) confirmaram a possibilidade de utilização de pares de iniciadores para as três espécies de *Leishmania* encontradas no estado. Silva e colaboradores (2008) utilizaram a PCR para isolar as cepas de *Leishmania* em flebotomíneos naturalmente infectados capturados em Campo Grande, capital do estado.

A confirmação através da PCR das cepas de *Leishmania* em vetores capturados em área de infecção humana e canina auxilia no norteamiento das ações de vigilância na localidade estudada (ACARDI *et al.*, 2010; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006; SARAIVA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2010).

Os pares de primers 13A e 13B (RODGERS *et al.*, 1990) utilizados neste estudo, possuem como alvo fragmentos de minicírculos de Kinetoplasto, uma região conservada em diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Em estudo desenvolvido por Medeiros, Rodrigues e Roselino (2005) foi utilizada a técnica da PCR em 54 biópsias de pele e mucosa usando os iniciadores 13A e 13B, encontrando assim 81,5% das amostras positivas.

Regiões não-codificadoras variáveis do DNAr são úteis na identificação de linhagens de *L. (L.) infantum chagasi* (TIAN; CHEN; HU, 2004), dentre estas regiões, o espaçador ITS-1 geralmente tem sido bem informativo, pois difere em tamanho e sequência entre as espécies (BAFFI; CERON, 2002).

As regiões ITS possuem sequências que variam dentro e entre as populações. Sua utilização como marcador molecular é possível graças a essas variações (MATEUS *et al.*, 2006), já que estima-se a presença de 20 a 200 cópias idênticas da região ITS-1 no genoma da *Leishmania*, região esta analisada no presente estudo (ODIWUOR *et al.*, 2010).

De acordo com Rosa (2010) esta região se apresenta como alvo preferencial para o diagnóstico de *Leishmania* através da PCR, corroborando com os achados no trabalho, que repetiu a reação para a região ITS-1 das amostras, tendo como resultado a confirmação de fragmentos de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* em uma das amostras.

A análise do comportamento de vetores em áreas urbanas, não pode prescindir do estudo do contexto ambiental em que os mesmos se encontram, incluindo vegetação, umidade e solo.

O uso de dados derivados de imagem de satélites permite o monitoramento da diversidade de vegetação e a delimitação de áreas de risco para doenças endêmicas como a LVA. Uma vez que a vegetação e a umidade tem forte influência na manutenção de espécies vetoras (FORATTINI, 1973). O cálculo do índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI), índice de vegetação ajustada ao solo (SAVI) e do índice de água por diferença normalizada (NDWI), possibilitou a classificação e interpretação da área estudada.

Jackson *et al.* (2004) falam sobre as limitações do NDVI. A relação entre o teor de clorofila em cada espécie de planta e o índice de água na vegetação é único, sendo assim uma redução no teor de clorofila não implica em redução no índice de água na vegetação. Assim justifica-se a utilização do NDWI, que mensura a quantidade de água presente na vegetação, para complementar os resultados do NDVI, já que o mesmo pode ser afetado por outras variáveis.

Para que as informações sejam cada vez mais precisas, alguns índices de correção são utilizados em diversos trabalhos. Gialbert *et al.* (2002) propõem a utilização do SAVI afirmando que as variações ocorridas no fundo do solo interferem

nos resultados; assim a utilização desse índice corrigiu as possíveis alterações que podem interferir nos resultados relacionados ao NDVI.

A análise da cobertura vegetal por meio do NDVI e a correlação desse índice com vetores e casos de leishmaniose, podem ser observadas em estudos desenvolvidos por Aparício e Bitencourt (2004) em São Paulo, por Carneiro e colaboradores (2004) na Bahia, por Zeilhofer *et al.* (2008) em Mato Grosso e por Oliveira e colaboradores (2012) em Mato Grosso do Sul.

Não há registros de estudos que tenham o objetivo de avaliar a cobertura vegetal e a sua relação com a distribuição espacial de vetores em área de fronteira com outro país. Em Ponta Porã a análise da cobertura vegetal por meio do NDVI, mostrou a presença de vegetação em níveis elevados em três dos sete pontos escolhidos. Após a utilização do SAVI, cinco dos sete pontos de captura mostraram valores elevados de fitomassa.

O ponto 3 apresentou valor elevado de NDVI, SAVI e NDWI e também maior diversidade de espécies de flebotomíneos, o que pode ser explicado pelo fato do mesmo estar inserido em um terreno com presença de mata nativa em todo entorno o que sugere maior grau de umidade no ambiente, mantendo assim condições favoráveis para o desenvolvimento do vetor (FORATTINI, 1973).

Este resultado corrobora com estudo desenvolvido por Fernández *et al.* (2010) que associaram espécies à presença de árvores e matas próximas ao ponto de captura em área urbana, fato também descrito por Cutolo, Camargo e Zuben (2009) na região sudeste.

A captura de espécies como *Ny. whitmani* são coincidentes com os dados da literatura, que relatam a presença da mesma não só em área de mata, mas em ambiente antropizado. Mesmo em áreas urbanizadas pode ocorrer, como observado em Ponta Porã, a manutenção de áreas preservadas que funcionam como corredores ecológicos, possibilitando aos vetores conseguirem alcançar as residências e quando infectados, transmitirem ao homem (APARÍCIO; BITENCOURT, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2011; LEGRIFON *et al.*, 2012; RANGEL; LAINSON, 2009).

Oliveira e colaboradores (2003) observaram maior diversidade de espécies em regiões de mata em estudo realizado em Campo Grande (MS) e Nunes *et al.* (2008) também fizeram essa associação em levantamento realizado em Bonito (MS).

A associação de vetores a áreas com elevado índice de vegetação também foi observada em estudo realizado em Campo Grande (MS) por Oliveira *et al.* (2012).

Dentre os possíveis abrigos para os flebotomíneos descritos por Forattini (1973) a presença de vegetação constitui ecótopo adequado para a manutenção de formas aladas e larvais, apresentando uma diversidade maior de plantas que servem como fonte de alimento para os machos e de hospedeiros vertebrados, que atuam como fonte alimentar para as fêmeas.

O NDWI é um índice que tem relação direta com o teor de água na vegetação e umidade do solo, fato importante, já que as fases larvais dos flebotomíneos necessitam de ambiente com umidade como observado por Amaral *et al.* (2011). Não há relato na literatura referente à associação desse índice com a problemática das leishmanioses.

O Ponto 4 de captura, apresentou valores mínimos de vegetação e de umidade de acordo com os valores de NDVI, SAVI e NDWI. Essa residência está localizada em um bairro na área central de Ponta Porã, inserido na área quatro, local onde houve concentração de casos humanos e caninos como citado anteriormente. O maior número de flebotomíneos também foi coletado nesse local, sendo todos pertencentes à espécie *Lu. longipalpis*.

Donalisio e colaboradores (2012) observaram situação semelhante em Pernambuco ao estabelecerem associação negativa entre as espécies capturadas e o valor elevado de NDVI na região.

A concentração de casos humanos e caninos em local onde houve maior captura de vetores, também foi observado por Prado *et al.* (2011) em Montes Claros, por Bigeli, Oliveira-Júnior e Teles (2012) em Palmas.

Na Bahia, Carneiro *et al.* (2004) observaram valores baixos de NDVI em local com registros de *Lu. longipalpis* em número elevado e de casos humanos, o que pode sugerir ações antrópicas sobre a vegetação, corroborando com o observado em Ponta Porã.

Neste estudo foi observada correlação negativa entre o NDVI e os casos caninos notificados. A concentração dos mesmos ocorreu em área onde foi encontrado baixo índice de vegetação o que caracteriza um ambiente modificado. Esse achado é importante do ponto de vista epidemiológico, pelo fato dos cães agirem como principais reservatórios domésticos da *Leishmania* em área urbana (DANTAS-TORRES, 2009).

Margonari e colaboradores (2006) observaram a ocorrência de casos de leishmaniose canina e humana em locais com presença de vegetação, o que difere do que foi encontrado em Ponta Porã.

A avaliação de umidade na vegetação estudada, por meio do NDWI, é extremamente importante por estar diretamente ligada às condições de desenvolvimento da forma imatura do inseto.

A coleta de *Lu. longipalpis* em todos os meses do ano associada à presença da mesma em ambientes com pouca umidade, além da correlação positiva com a temperatura, indica não haver um único ambiente característico com condições específicas para o desenvolvimento e sobrevivência desses vetores.

Neste estudo pode-se observar o encontro de *Lu. longipalpis* em elevada quantidade em local com concentração mínima de umidade (Ponto 4). Esse resultado diverge do que é relatado na literatura, pois de acordo com Forattini (1973), os flebotomíneos são insetos holometábolos sendo que suas fases larvais necessitam de matéria orgânica depositada no solo para alimentação, o que requer a existência de umidade, fundamental para a manutenção de criadouros.

É comum o encontro da espécie em áreas modificadas, como já citado anteriormente, mas a presença da mesma em ambiente que tem como característica condições mínimas de umidade, sugere que o vetor esteja cada vez mais adaptado, tanto em sua fase larval, quanto alada ao meio artificial criado pelo homem e que a quantidade de matéria orgânica encontrada em área domiciliar é suficiente para a manutenção de condições propícias para o desenvolvimento de *Lu. longipalpis*.

O fato de ter sido a espécie capturada com mais frequência e com valores elevados dentro das residências, indica a estreita associação que vem sendo estabelecida com o homem, o que deve ser motivo de alerta, já que Ponta Porã registra casos de leishmaniose em humanos desde 2007 e *Lu. longipalpis* é o principal vetor da *L. (L.) infantum chagasi*.

Ao se estudar o padrão das doenças infecciosas ocasionadas por vetores, percebe-se que o conhecimento dos agentes transmissores, dos reservatórios e das características ecológicas, torna-se fundamental para o norteamo das ações de controle (BIGELI *et al.*, 2012; MARGONARI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A utilização das geotecnologias permite a avaliação mais precisa das características ecológicas relacionadas ao habitat do vetor em áreas antropizadas e endêmicas para leishmaniose, que traz novas perspectivas para o controle da

doença. A análise do ambiente onde esta ocorre e o conhecimento da espacialização dos casos registrados auxiliam no norteamento e delineamento de ações de saúde (APARÍCIO; BITENCOURT, 2004).

Considerando o cenário atual das leishmanioses em todo o mundo, fica claro que o controle da mesma vem se mostrando cada vez mais complexo. As mudanças ambientais associadas ao desenvolvimento urbano das cidades estão contribuindo para a contínua modificação do ciclo da LVA e estudos que analisem tais particularidades, tornam-se cada vez mais necessários (CHAPPUIS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

## 7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínea encontrada em Ponta Porã é composta por 8 espécies: *Lutzomyia longipalpis*; *Evandromyia cortelezii*; *Pintomyia pessoai*; *Brumptomyia brumpti*; *Nyssomyia whitmani*; *Psathyromyia shannoni*; *Sciopemyia sordellii*; *Pintomyia monticola*; sendo que *Lutzomyia longipalpis* contribuiu com 97,03% dos exemplares capturados, sendo o mais frequente e o mais abundante na área estudada.

A presença de *Lu. longipalpis* em todos os pontos de captura e quase que de maneira exclusiva, demonstra a adaptação da mesma ao ambiente antropizado.

A maior parte dos exemplares de *Lu. longipalpis* foi encontrada no intradomicílio.

Observou-se presença de *Lu. longipalpis* em todos os meses do ano nas áreas amostradas, com picos em sua densidade após períodos chuvosos na área estudada, além da associação do aumento de exemplares em períodos com elevada temperatura.

O elevado número de machos capturados na região através da armadilha de Shannon sugere a ocorrência de comportamento de agregação visando atrair as fêmeas para o acasalamento.

A presença de *Ny. whitmani* em área urbana constitui motivo de alerta, já que a mesma se mostrou presente tanto em ambientes com resquícios de mata quanto em áreas urbanizadas.

A captura de uma fêmea de *Evandromyia cortelezii* infectada naturalmente com *L. (L.) infantum chagasi* através da armadilha de Shannon demonstra a antropofilia da espécie na área estudada e a presença do parasita entre os hospedeiros invertebrados.

A utilização do NDVI, NDWI, e SAVI foi de extrema importância pelo auxílio que os mesmos trazem na caracterização do meio em que foi realizada a pesquisa, mas através da análise estatística foi observada ausência de correlação entre os índices com os flebotomíneos coletados.

Não houve correlação entre os casos humanos e caninos de leishmaniose com o número de *Lu. longipalpis* capturados.

A distribuição de casos caninos apresentou correlação positiva com os baixos índices de vegetação, havendo concentração dos mesmos em área urbanizada.

A área central de Ponta Porã deve ser monitorada pelo fato de ter havido maior captura de exemplares, concentração de casos de leishmaniose em cães e em humanos. A área também apresenta resquícios de vegetação nativa, favorecendo a formação de corredores ecológicos para os vetores da leishmaniose o que requer ações efetivas de vigilância em saúde.

## REFERÊNCIAS

- ACARDI, S. A.; SANTINI, M. S.; ROMAGOSA, C. M.; SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 796-799, Sept. 2010.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 3, p. 207-255.
- AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; SCHUBACK, P. A.; SOUCASAUX, T.; AZEVEDO, A. C. R. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro: IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 465-482, Oct./Nov. 1985.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, Dec. 2002.
- ALEXANDER, J. B.; YOUNG, D. G. Dispersal of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (L.) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 397-403, July./ Sept. 1992.
- ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, A. D.; MINZÃO, L. D.; PORTES, F.; MIRANDA, A. M.; FACCENDA, O.; ANDRADE-FILHO, J. D. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de leishmaniose visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 2, p. 304-310, jun. 2010a.
- ALMEIDA, P. S.; MINZÃO, E. R.; MINZÃO, L. D.; SILVA, S. R.; FERREIRA, A. D.; FACCENDA, O.; ANDRADE-FILHO, J. D. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 723-727, nov./dez. 2010b.
- AMARAL, A. F. S.; VARJÃO, J. R.; SILVA, G. B.; ARRAIS-SILVA, W. W. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área residencial e em fragmento de cerrado no município de Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 165-167, abr./jun. 2011.

ÁMORA, S. S.; BEVILAQUA, C. M.; FEIJÓ, F. M.; PEIXOTO, G.C.; SOUSA, R. N.; ALVES, N. D.; OLIVEIRA, L. M.; MACEDO, I. T. Sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) survey in an urban transmission area of visceral leishmaniasis, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n.4, p.233-237, Oct./Dec. 2010.

ANDRADE, A. R. O. **Armadilha automática luminosa armada no intra e no peridomicílio, residência urbana, Ponta Porã, Mato Grosso do Sul.** 2010a. 1 fotografia.

ANDRADE, A. R. O. **Coleta manual flebotomíneos com armadilha de Shannon na cor branca, área urbana, Ponta Porã, Mato Grosso do Sul.** 2010b. 1 fotografia.

ANDRADE, A. R. O. **Pontos de captura de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul.** 2010c. 1 fotografia.

ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; ARRUDA, C. C.; SANTOS, M. F. C.; ROCCA, M. E. G.; AQUINO, R. B. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 5, p. 488-493, Sept./Oct. 2009.

ANDRADE, M. S.; BRITO, M. E. F.; SILVA, S. T.; LIMA, B.,S.; ALMEIDA, E. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; MARINHO JUNIOR, J. F.; ISHIKAWA, E.; CUPOLLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 229-233, maio/jun. 2005.

ANDRADE-FILHO; J. D.; BRAZIL, R. P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas State, Northeast of Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 688-690, Sept. / Oct. 2009.

ANDRADE-FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto,1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 481-487.2007.

ANTONIALI, S. A. C.; TORRES, T. G.; PARANHOS-FILHO, A.C.; TOLEZANO, J. E. Spatial analyses of American Visceral Leishmaniasis, in Mato Grosso do Sul, State, Central-Brazil. **Journal of Infection**, London, v. 54, n. 5, p. 509-514, May.2007.

APARICIO, C.; BITENCOURT, M. D. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar America. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 4, p.511-516, ago. 2004.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AURES, D. L.; SANTOS, A. S. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas.** Belém: MCT/CNPQ, 2007.

AZEVEDO, P. C. B.; LOPES, G. N.; FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, G. C.; MORAES, J. L. P.; REBÊLO, J. M. M. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 2, p. 271-277, May./April 2011.

BADARÓ, R. D. M.; DUARTE, C. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Org.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1234-1259.

BAFFI, M. A.; CERON, C. R. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and their hybrids. **Biochemical Genetics**, v. 40, n. 11/12, p. 411-421, Dec. 2002.

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, R. S.; FIUZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M. DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 421-425, set./out. 2005.

BARRETTO, M. P. **Observações sobre a Biologia, em Condições Naturais, dos Flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)**. 162 f. 1943. Tese (Concurso de Docência Livre), Faculdade de Medicina-USP/São Paulo, 1943.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, perspectiva e controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, set. 2004.

BEJARANO, E. E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VELEZ, I.; D. Phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colômbia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 645-647, July 2002.

BIBLIA de estudo de Genebra. 2. ed. São Paulo: Cultura Cristã, 2009.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P.; TELES, N. M. M. Identificação de cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua relação com aspectos ambientais e sanitários no município de Palmas, Estado do Tocantins, Brasil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 1, p.18-23, jan./fev. 2012.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P. H.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L. Atypical forms of canine leishmaniasis. **Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, Sept. 2001.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 5, p. 503-508, set./out. 2009.

BRAGA-MIRANDA, L.; MIRANDA, M.; GALATI, E. A.B. Phlebotomine fauna in a rural area of the Brazilian Pantanal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo v. 40, n. 2, p. 324-326, out. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. (Série A - Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância de leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. **Situação epidemiológica das zoonoses de interesse à saúde pública**, ano 9, n. 1, jun. 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_epidemiologico\\_zoonoses\\_062009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epidemiologico_zoonoses_062009.pdf)>. Acesso em: 24 mar. 2010.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia – biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 257-274.

BRAZIL, R. P.; CABALLERO, N. N.; HAMILTON, J. G.C. Identification of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Asunción, Paraguay. **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 51, p. 1-3, Nov. 2009.

BRAZIL, R. P.; PONTES, M. C. Q.; PASSOS, W. L.; FUZARI, A.; BRAZIL, B. G. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema: potential area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, n. 45, v. 1, p. 120-121, jan./fev. 2012.

CÂMARA, J. S. M. G. **Geoprocessamento para projetos ambientais**. São José dos Campos: INPE, 1996.

CARNEIRO, D.; BAVIA, M. E.; ROCHA, W.; LOBÃO, J.; MADUREIRA-FILHO, C.; OLIVEIRA, J. B.; SILVA, C. E.; BARBOSA, M. G.; RIOS, R. Identificação de áreas de risco para leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (2000-2002). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 28, n. 1, p. 19-32, jan./jun. 2004.

CARVALHO, G. M. L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; LIMA, A. C. V. M. R.; GONTIJO, C. M. F. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**. Larchmont, v. 8, n. 3, p. 407-414, June 2008.

CARVALHO, M. R. LIMA, B. S.; MARINHO-JÚNIOR, J. F.; SILVA, F. J.; VALENÇA, H. F.; ALMEIDA, F. A.; SILVA, A. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest

region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, May 2007.

CASANOVA, C. A soil emergence trap for collections of Phlebotomine sand flies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 273-275, Jan. 2001.

CASANOVA, C.; MAYO, R. C.; RANGEL, O.; MASCARINI, L. M.; PIGNATTI, M. G.; GALATI, E. A. B.; GOMES, A. C. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the valley of the Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. **Bolletín de Dirección de Malariología & Saneamiento Ambiental**, v. 35, supl. 1, p. 77-84, Jan.1995.

CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS- CEPETEC. 2010. **Precipitação e Temperatura de Ponta Porã**. Disponível em: <<http://bancodedados.cptec.inpe.br/climatologia/Controller>>. Acesso em: 10 jul. 2010.

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (CEVS). **Situação da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul**. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825393188SITUA%C7%C3O%20NO%20R%20S.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, L.; PEELING R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature**, Geneva, v. 5, n. 10, p. 873-880, Nov. 2007.

CONSOLI, ROTRAUT A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz,1994.

CORTADA, V. M.; DORVAL, E. SOUZA LIMA.; M. A. A.; OSHIRO, E. T.; MENESES, C. R. V.; ABREU-SILVA, A. L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C. S. F.; CARDOSO, F. O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R. P.; CALABRESE, K. S.; GONÇALVE DA COSTA, S. C. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 365-374, July 2004.

COSTA, P. L. **Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral, Agreste de Pernambuco**, 2011, 92 f. Dissertação (Mestrado em saúde pública) – Centro de Pesquisas Ageu Magalhães/Fiocruz, Recife, 2011.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 149-153, Mar. 2007.

COSTA, A. I. P.; CASANOVA, C.; RODAS, L. A. C.; GALATI, E. A. B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana

no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p. 632-633, mar.1997.

CUTOLO, A. A.; CAMARGO, D. A.; CUTOLO, A. A.; ZUBEN, C. J. V.; GALATI, E. A. B. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) em Cuesta Basáltica, na bacia hidrográfica do Rio Corumbataí, Região Centro-leste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.11, n.2., p.336-339, fev. 2008.

CUTOLO, A. A.; CAMARGO, D. A.; ZUBEN, C. J. V. Novos registros de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) na região Centro-Leste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 62-65, jan./mar. 2009.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; SOUZA, R. L. Leishmania (*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, n. 1, p. 73-74, Jan. 2010.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, fev. 2006a.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, Mar. 2009.

DANTAS-TORRES, F.; ANDRADE, A. J.; TENÓRIO, K. E. R.; ANDRADE-FILHO, J. D.; BALBINO, V. Q.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 733-736, nov./dez. 2010.

DE ROUSE, J. W.; HAAS, R. H.; SCHELL, J. A.; DEERING, D. W. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. ERTS Symposium, 3. In: **Proceedings...**, NASA, sp. 351, v. 1, Washington, DC, p. 309–317, 1974.

DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA SILVA, J. C.; MICHALSKY, E.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 49-52, jan./fev. 2007.

DONALISIO, M. R.; PETERSON, A. T. COSTA, P. L.; SILVA, F. J.; VALENÇA, H. F.; SHAW, J.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Microspatial distributional patterns of vectors of cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 21, p. 1-8, Oct. 2012.

DORVAL, M. E. C. **Flagelados observados durante a dissecação do trato digestório de fêmea de *Evandromyia cortelezii* capturada em área urbana do município de Ponta Porã, Mato Grosso do Sul.** 2010. 1 fotografia.

DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILLO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina de Tropical**, Uberaba, v. 39, n.1, p.43-46, jan./fev. 2006.

DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; ALVES, T. P.; ALVES, M. A.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; CUNHA, R. V. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 695-702, Aug. 2009.

DORVAL, M.E.C; ALVES, T. P.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; ALVES, M. A.; OSHIRO, E. T; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; CUNHA, R. V. Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the State of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 5, p. 491-495, Feb. 2010.

EL TAIL, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FAR, M.; PRESBEFI, W.; SCHIINIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 2, p. 575-579, Feb. 2000.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no Município de Araçatuba: São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, set./out. 2000.

FELICIANGELI, M. D., Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, n. 4, p.119-124. 1987.

FÉRNANDEZ, M.S.; SALÓMON, O. D.; CAVIA, R.; PEREZ, A. A.; ACARDI, S. A., GUCCIONE J.D. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Tropica**, London, v.114, n. 2, p. 81-87, May 2010.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 2, p. 200-201, Feb. 2008.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica. Psychodidae, phlebotominae, leishmanioses, bartonelose.** 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher/USP, 1973.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 255-261, jan. 1972.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 214-221, Apr. 2006.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-51.

GALATI, E. A. B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae):** morfologia e terminologia de adultos. São Paulo: Departamento de Epidemiologia/Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo, 2004. v. I e II. Mimeografado. (Apostila de Entomologia Médica).

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; ROCHA, I. C.; GARCIA, W. B. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 115-28, abr. 1996.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO JR., F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 378-90, ago. 1997.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; GONÇALVES-ANDRADE, R. M.; NAUFEL, G. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n.5., p. 641-647, July 2001.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; CRISTALDO, G. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 2, p. 235-261, jul./dez. 2003.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E.T.; DAMASCENO-JUNIOR G. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. 17-193, Mar. 2006.

GALATI, E. A. B.; MARASSÁ, A. M.; GONÇALVES-ANDRADE, R. M. CONSALES, C. A. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 3, p.477-487, Sept. 2010.

GAMA-NETO, J. L.; FREITAS, R. A.; BAIMA, J. M.; PASSOS, M. A. B. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**, Manaus, v. 1, n. 2, p. 131-136, jun. 2010.

GAO, B. C. NDWI : a normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. **Remote Sensing Environment**, New York, v. 58, p. 257-266, April 1996.

GIBSON, G.; TORR, S. J. Visual olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.1, n13, p 2-23, Mach. 1999.

GIALBERT, M. A.; GONZÁLEZ-PIQUEIRAS, J.; GARCÍA-HARO, J. F.; MELÍA, J. A generalized soil-adjusted vegetation index. **Remote Sensing Environment**, New York, v. 82, p. 303-310, Mar. 2002.

GLCF - GLOBAL LAND COVER FACILITY/ U.S. GEOLOGICAL. LANDSAT TM. Imagem de satellite. Canais 1,2,3,4,5 e 7. Órbita/Ponto: 225/073. Julho de 2000. Disponível em: <http://glcf.umd.edu/index.shtml>.> Acesso em: 18 de novembro de 2011.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./fev. 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Curitiba v. 7, n.3, p. 338-349, set. 2004.

GOOGLE IMAGENS. Ciclo da leishmaniose 2012. Disponível em: <http://www.google.com.br/imgres?q=ciclo+da+leishmaniose&hl=pt-BR&biw>. Acesso em: 20 jun.. 2012.

GRAPHPAD SOFTWARE. **GraphPad Prism 5.0**. La Jolla: GraphPad Software, 2011.

GRIZARD, E. C.; STEINDEL, M.; SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A. Y.; CARVALHO-PINTO, C. J. de; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H. K.; LIMA FILHO, J. H. C.; ROMANHA, A. J.; CAMPBELL, D. A. Characterization of Leishmania strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, London, v. 74, n. 1, p. 89-93, Jan. 2000.

HADDOW, A. J. Studies on the biting habits and medical importance of East African mosquitoes in the genus *Aedes*. I - Subgenero *Aedimorphus*, *Banksinella* and

*Nunnius. Bulletin of Entomological Research*. Cambridge, v. 50, n. 4, p. 759-779, 1960.

HAYEK, L. A. C.; BUZAS, M. A. **Surveying natural populations**. New York: Columbia University Press, 1997.

HUETE, A. R. A soil-adjusted vegetation index (SAVI), **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 25, p. 295-309, 1988.

INPE – INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. LANDSAT TM. Imagem de satélite. Canais 1,2,3,4,5 e 7. Órbita/Ponto: 225/075. Julho de 2010. Disponível em <<http://www.inpe.br>> Acesso em: 12 dez. de 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE cidades 2011**: Ponta Porã, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ms#>>. Acesso em: 12 fev. 2012

JACKSON, T. J.; CHEN, D.; COSH, M.; LI, F.; ANDERSON, M.; WALTHALL, C.; DORIASWAMY, P.; HUNT, E. R. Vegetation water content mapping using Landsat data derived normalized difference water index for corn and soybeans. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 92, p. 475-482, Jan. 2004.

JONES, T. M.; QUINNEL, R. J. Testing predictions for the evolution of lekking in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behaviour**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 605-612, Mach. 2002.

JUSI, M. M. G.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O.; MACHADO, R. Z. Detecção sorológica e molecular de *Leishmania* spp. em animais selvagens do zoológico de Ilha Solteira, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 219-222, jul./set. 2011.

KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; CALVOPIÑA, M.; MARCO, J. D.; BARROSO, P. A.; GOMEZ, E. A.; MIMORI, T.; KORENAGA, M.; IWATA, H.; NONAKA, S.; HASHIGUSHI, Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 87-93, Nov. 2005.

KELLY, D.W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behavior**, v. 53, n. 4, p.721-731, Oct. 1997.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, Shanghai, v. 7, n. 11-12, p. 1224-1234, Aug. 2005.

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

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of Leishmania isolated from man and forest animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 64, n. 5, p. 654-667, May 1970.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A. Amazonian visceral leishmaniasis: distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135-137, Jan./Mar. 1990.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* e a ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 311-336.

LAINSON, R., SHAW, J. J., SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 81, n. 3, p. 517, July 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis: the neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Org). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**, 22. ed. Sidney: Auckland, 2005. chap. 17, p. 313-349.

LE PONT, F.; DESJEUX, P. Phlébotomes de Bolivie: V. *Lutzomyia brisolai* n.sp., nouvelle espèce de phlébotome anthropophile de région subandine (Diptera, Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 319-323, juil./sept. 1987.

LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHÖNIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: on the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 11, v. 5, p.1091-1095, July 2011.

LEGRIFFON, C. M. O.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; FENELON, V. C.; ABREU, H. C. N.; TEODORO, U. Frequência de flebotomíneos em ambiente rural com boas

condições de limpeza e organização, no Estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 77-82, jan./fev. 2012.

LEMOS J. C., LIMA, S. C. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos em área de transmissão no município de Uberaba, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 1, p. 22-26, jan./fev. 2005.

LIMA, H.; DE GUGIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 169-174, Mar. 2002.

LIMA JÚNIOR, M. S. C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; MATOS, M. F. C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio de reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 1, p.1-6, maio/jun. 2009.

LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Leishmaniose Tegumentar Americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2713-2716, dez. 2006.

LYNN, A. J.; COHNSTAEDT, L. W.; BEATI, L.; TERA'N, R.; LEO, R.; MUNSTERMANN, L. E. New records of phlebotomines sand flies (DIPTERA: PSYCHODIDAE) from Ecuador. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 112, n. 1, p.47-53, Mar. 2010.

MACMORRIS-ADIX, M. Leishmaniasis: A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite *Leishmania*. **Macalester Reviews in Biogeography**, Dakota, v.1, n.1, p. 1-19, July 2009.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 271-280, Aug. 2006.

MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) of the world. **Entomological News**, v. 118, n. 4, p. 351-356, Sept./Oct. 2007.

MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C. M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A. C.; PESSANHA, J. E., DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p. 31-38, Feb. 2006.

MAROLI, M.; FERICIANGELI, M. D.; ARIAS, J. **Métodos de captura, conservacion y montage de los flebotomos (Diptera: Psychodidae)**. Whashington: OPS, 1997.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina de Tropical**, Uberaba, v. 30, n.1, p. 162-164, set. 1997.

MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do *cluster buzzatii* de *drosophila* (diptera: drosophilidae). **Ambiência**, v. 2, n.1, p. 89-96, mar. 2006.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. **Relatório das atividades de vigilância e controle da leishmaniose visceral no município de Ponta Porã-MS, Período de 11 a 13 de março de 2008**, Campo Grande: SES, 2008.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. **Relatório parcial de notificações de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul**, Campo Grande: SES, 2012.

MEDEIROS, A .C. R.; RODRIGUES, S. S.; ROSELINO A. M. F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine Research**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 4, p. 421-424, Apr. 2005.

MELLO, D. A. ; REGO JÚNIOR, F. A.; OSHIRO, E. ; NUNES, V. L. *Cerdocyon thous* (L.) (*Carnivora, Canidae*) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 259, Apr./June 1988.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.;FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; SILVA, F. O.; LOUREIRO, A. M. F.; FORTES-DIAS, C. L. F.; DIAS, E. S. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 56-61, fev. 2009.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES, K. S. G.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Infecção natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n.1, p. 58-62, jan./fev. 2011.

MICROSOFT Office Enterprise, 2010. **Office Excel®**. s.l. Microsoft Corporation, 2011.

MIGONE, E. L. Un caso de Kalazar in Assunción (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 6, p.118-120, 1913.

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

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

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, MICHALSKY, E. M.; DIAS, S. E. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n.1, p. 76-78, jan./fev, 2011.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F. da; COSTA, R. T. da; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V. de.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 147-152, mar./abr. 2005.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1, p.163-167, June 2004.

MUNIZ, L. H. G.; ROSSI, R.; NEITZKE, H. C.; MONTEIRO, W. M.; TEODORO, U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1087-1093, dez. 2006.

NASCIMENTO, J. C.; PAIVA, B. R.; MALAFRONTA, R. S.; FERNANDES, W. D.; GALATI, E. A. B. Natural infection of phlebotomines (*Diptera: Psychodidae*) in visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 49, n. 4, p.119-122. Mar./April 2007.

NATAL, D.; MARUCCI, D.; REIS, I. M.; GALATI, E. A. B. Modificações da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 35, n. 4, p. 697-700, out./dez.1991.

NEITZKE, H. C.; SCODRO, R. B. L.; CASTRO, K. R.; SVERSUTTI, A. C. D.; SILVEIRA, T. G. V.; TEORODO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n.1, p.17-22, jan./fev. 2008.

NERY-COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial.

**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 4, p. 415-419, jul./ago. 2007.

NUNES, V. L. B.; YAMAMOTO, Y. I.; REGO JR., F. A.; DORVAL, M. E. C.; GALATI, E. A. B.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 17-21, 1988.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'ÁURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina de Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 3, p. 301-302, maio/jun. 2001.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CARDOZO, C.; ROCCA, M. E. G., ANDRADE, A. R. O.; SANTOS, M. F. C.; AQUINO, R. B.; ROSA, D. Study of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the urban area of Bonito municipality, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 52, n.3, p. 446–451, Sept. 2008.

ODIWUOR, S. O. C.; SAAD, A. A.; DONCKER, S. D.; MAES, I.; LAURENT, T.; SAFI, S. E.; MBUCHI, M.; BÜSCHER, P.; DUJARDIN, J. C.; AUWERA, G. V. Universal PCR assay for differential detection of all Old World *Leishmania* species. **Europa Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 30, n, 2, p. 209-218. Oct. 2010.

OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE-FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo da fauna flebotomínea (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 933-944, jul./ago. 2003.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R. O.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, n. 8, p. 869-874, dez. 2006.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; FERNANDES, C. E.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, **Acta Tropica**, London, v. 105, n.1, p.55-61, Jan. 2008.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 446-450, set./out. 2006.

OLIVEIRA, D. M. S.; SARAIVA, E. M.; ISHIKAWA, E. A.; SOUSA, A. A. A.; SILVA, E. O.; SILVA, I. M. Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p.1039-1044, Dec. 2011.

OLIVEIRA, G. M. G.; FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; ANDRADE, G. M. C.; ARAÚJO, L. D.; OLIVEIRA, M. L. G.; CUNHA, R. V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n. 3, p. 83-94, set. 2010.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDE, T. D.; OSHIRO, E.; OLIVEIRA, A. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n.2, p. 188-193, mar./abr. 2010.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS-FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Biotoc factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic área of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, p. 396-401, May. 2012.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 6, p. 540-543, Nov./Dez. 2006.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE- JUNIOR, H. F. A.; MALAFRONTA, R. S. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n.1, p. 87-94, Jan. 2007.

PARANHOS-FILHO, A. C., LASTORIA, G.; TORRES, T.G. **Sensoriamento remoto ambiental aplicado**: introdução às geotecnologias. Campo Grande: UFMS, 2008.

PARANHOS-FILHO; A. C.; FIORI, A. P.; DISPERATI, L.; LUCCHESI, C.; CIALI, A.; LASTORIA, G. Avaliação multitemporal das perdas dos solos na bacia do rio taquarizinho através de SIG. **Boletim Paranaense de Geociências**, Curitiba, v. 52, n.1, p.49-59, jan./jun. 2003.

PAULA, M. B. C.; RODRIGUES, E. A. S.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; PAULA, F. P.; PAJUABA-NETO, A. A.; LIMONGI, J. E. First finding of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in the urban area of Uberlandia, MG, concomitant with the first reported autochthonous case of human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 3, p. 304-305, maio/jun. 2008.

PCI GEOMATICS. **PCI Geomatica. Versão 10.2.1 for Windows**. Ontário, Canadá, 2009. 1 CD-ROOM.

PINTO, I. S.; SANTOS, C. B.; GRIMALDI-JUNIOR, G.; FERREIRA, A. L. L.; FLAQUETO, A. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the state of Espírito Santo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 365-372, Feb. 2010.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRAZIL, R. P.; BERTHO, A. L.; BARBOSA, A. F.; BRITTO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 99, n.12, p. 905-913, Sept. 2005.

PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. **Sensoriamento remoto no estudo da vegetação**. São José dos Campos: Parêntese, 2007.

PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 5, p. 561-566, set./out. 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parassitology**, Roma, v. 136, n. 3, p. 1915-1934, July . 2009.

QUINNELL, R. J.. DYE, C.. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 8, n.3, p.219–224, July.1994.

RANGEL, E. F; LAINSON ,R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, Nov. 2009.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, dez. 2008.

RANGEL, O.; SAMPAIO, S. M. P.; CIARAVOLO, R. M. C.; HOLCMAN, M. M. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 2, p.163-169, Mar. 2012.

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

REBÊLO, J. M.; ROCHA, R. V.; MORAES, J. L. P.; SILVA, C. R. M.; LEONARDO, F. S.; ALVES, G. A. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different

phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n.3, p. 494–500, Sept. 2010.

REGO, J. R. F. A.; NUNES, V. L. B.; PEREIRA, M. J. S.; CAVALHEIROS, M. E. M.; SILVA, R. P.; BARROS, E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá-MS. Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 8. In: **Resumos...**, São Paulo, p. 2, 1983.

REINHOLD-CASTRO, K. R.; SCODRO, R. B. L.; DIAS-SVERSUTTI, A.C.; NEITZKE, H. C.; ROSSI, R. B.; KUHL, J. B.; SILVEIRA, T, V, G.; TEODORO, U. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 3, p. 269-276, maio/jun. 2008.

RESENDE, M. C.; CAMARGO, M. C. V.; VIEIRA, J. R. M.; NOBI, R. C. A.; PORTO, N. M.; OLIVEIRA, C. D. L.; PESSANHA, J. E.; CUNHA, M. C. M.; BRANDÃO, S. T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 51-55, Jan./Feb. 2006.

ROBERTS, D. R.; HSI, B. P. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 8, p. 1007-1013, 1979.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, Jaboticabal, v. 71, n. 3, p. 267-275, Oct.1990.

ROSA, C. S. A. **Pesquisa de mutação do gene predito da Lectina Ligante de Manose em cães**: Comparação entre dois alvos para diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral Canina. 67f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas - Genética) - Instituto de Biociências –UNESP, Botucatu, 2010.

ROSA, J. R.; SALOMÓN, O. D.; ANDRADE-FILHO, J. D.; CARVALHO, G. M. L.; SZELAG, E. A.; STEIN, M.; TAPIA, E. S.; BRAZIL, R. P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Province of Chaco, Argentina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 303-305, Mar./April 2010.

SALOMÓN, O. D.; QUINTANA, M. G.; ZAIDENBERG, M. Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 282-287, May 2008.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**. São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-27, 1997.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medicine Veterinary Entomology**, London, v. 12, n. 3, p. 315-17, July 1998.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R.L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P;

MATTOS, L. S. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.1, p.41-45, Jan./Feb. 2010.

SARAIVA, L.; LOPES, J. S.; OLIVEIRA, G. B. M.; BATISTA, F. A.; FALCÃO, A. L.; ANDRADE-FILHO, J. D. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n.1, p. 56-63, jan./fev. 2006.

SARAIVA, L.; ANDRADE-FILHO, J. D.; SILVA, S. O.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 195, n. 8, p.1033-1039, Dec. 2010.

SAVANI, E. M. S. **Aspectos da transmissão de leishmanioses no Assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002-03: infecção natural em animais domésticos e vetores.** São Paulo, 2004. 142 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, 2004.

SEGATTO, M.; RIBEIRO, L. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; OLIVEIRA, M. R.; CARVALHO, S. F. G.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M. S.; DIETZE, R.; BRITO, C. F. A.; LEMOS, E. M. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 39-47, Feb. 2012.

SERGEANT, E. D.; SERGEANT, E. T.; LEMAIRE, E.; SENEVET, E. Hyphótese sur le phlebotome transmetteur et la tarent reservouir du virus du botoun du Orient. **Analles de l'Instut Pasteur D' Algérie**, Algéria, v. 29, p. 309-322, 1915.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world: a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, Aug. 2007.

SHERLOCK, I. A. A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 1, p. 15-21.

SHIMABUKURO, Y. E.; BATISTA, G. T.; MELLO, E. M. K.; MOREIRA, J. C.; DUARTE V. Using shade fraction image segmentation to evaluate deforestation in Landsat Thematic Mapper images of the Amazon Region. **International Journal of Remote Sensing**, v. 19, n. 3, p. 535-541, 1998.

SILVA, A. A. **Uso de Sensoriamento Remoto para o monitoramento ambiental dos cerrados.** Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 11. In: **Anais...** Universidade de São Paulo, p. 38, Setembro de 2005.

SILVA, E. S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C. M.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **The Veterinary Records**, London, v. 147, n. 15, p. 421-422, Oct. 2000.

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

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimetal Parasitology**, Jaboticabal, v.119, n. 3, p. 343-348, July 2008.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindembergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite: Journal de la Société Française de Parasitologie**, Paris, v. 9, n. 1, p. 43-50, Dec. 2002.

SILVEIRA, T. G.; TEODORO, U.; ARRAES, S. M.; LONARDONI, M. V.; DIAS, M. L.; SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; LAINSON, R. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the North of Parana State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 475-476, Jan. 1990.

SOARES, M. R. A.; CARVALHO, C. C.; SILVA, L. A.; LIMA, M. S. C. S.; BARRAL, A. M. P.; RÊBELO, J. M. M.; PEREIRA S. R. F. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 12, p. 2409-2413, dez. 2010.

SOUZA A. I.; BARROS E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G. R. B., NUNES V. L. B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 41-45, Mar. 2005.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDARADE- FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (*Diptera: Psychodidae phlebotominae*), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 1181-1182, June 2009.

SOUZA-PINTO, I.; SANTOS, C. B.; GRIMALDI –JR, G.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (*Diptera, Psychodidae*) in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p.365-372, Feb. 2010.

TEDESQUI, V. L.; CALLEJA, G. N. C.;PARRA, R.; PABÓN, J. P.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Vigilância ativa da leishmaniose tegumentar americana

em áreas endêmicas na Bolívia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n.1, p. 30-34, jan./fev. 2012.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extra florestais em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 129-133, Jan. 1993.

TEODORO, U.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; SILVA, A. M.; NEITZKE, H. C.; MONTEIRO, W. M.; LONARDONE, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 327-330, abr. 2006.

THOMÉ, S. M. G. Cuidado com as leishmanioses. **Cães e gatos**, São Paulo, n. 85, p. 46-50, 1999.

TIAN, Y.; CHEN, J. P.; HU, X. S. Cloning and sequence analysis of the ribosomal DNA ITS gene of *Leishmania donovani* isolates from hill foci of China. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases**, Pequim, v. 22, n. 5, p. 294-296, Oct. 2004.

VALDERRAMA, A.; TAVARES, M. G.; ANDRADE-FILHO, J. D. Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 427-434, Dec. 2011.

VEXENAT, J. A.; BARRETTO, A. C.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Epidemiological characteristics of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the State of Bahia. III. Phlebotomine fauna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 293-301, 1986.

VIEIRA, L. R. L.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P.; LAINSON, R.; SILVEIRA, F. T. Canine Visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: Comparison of the parasite density from the skin, lymphnode and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 5, p. 259-265, Sept./Oct. 2010.

VIVERO, R. J.; BEJARANO, E. E.; PÉREZ-DORIA, A.; FLÓRES, F.; ESTRADA, L. G.; TORRES, C.; MUSKUS, C. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), en los alrededores de la Ciudad de Sincelejo, Colombia. **Biota Neotropical**, v. 9, n. 4, p.277-280, enero 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**, 2011. Geneva: WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 23 mar 2011.

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

XIMENES, M. F. F.; SILVA, V. P. M.; QUEIROZ, P. V. S.; CORTEZ, M. M. R., M.; BATISTA, L. M. M.; MEDEIROS, A. S.; JERONIMIO, S. M. B. Flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil-reflexos do ambiente antrópico. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 128-137, jan./fev. 2007.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, México, v. 54, n. 1, p. 2-4, Feb. 1994.

ZEILHOFER, P.; KUMMER, O. P.; SANTOS, E. S.; RIBEIRO, A. L. M.; MISSAWA, N. A. Spatial modeling of *Lutzomyia (Nyssomia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) habitat suitability in the State of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 7, p. 653-660, Nov. 2008.

## ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FLEBOTOMÍNEOS

1. Secar o álcool isopropílico em estufa a 60°C;
2. Adicionar 200 µL de Tampão de lise e macerar os insetos com auxílio do homogeinizador;
3. Efetuar o choque térmico: 4 vezes no nitrogênio líquido e 4 vezes em Banho Maria à 60°C;
4. Adicionar 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e homogenizar;
5. Incubar por um período de duas horas à 55 °C;
6. Adicionar 300 µL de solução de desproteinização (Fenol 25 mL, Clorofórmio 24 mL, Álcool iso-amílico 1 mL);
7. Centrifugar a 13.000 r.p.m. por 15 minutos;
8. Pipetar o sobrenadante para um tubo de 1,5 mL e adicionar 2V de álcool isopropílico;
9. Manter a -20°C overnight (freezer);
10. Centrifugar a amostra a 12.000 r.p.m. por 10 minutos e desprezar o sobrenadante em seguida;
11. Adicionar 5 µL de RNase (4 mG/mL) e incubar por 20 minutos a 60°C;
12. Adicionar 200 µL de álcool etílico a 70% e centrifugar a 12.000 r.p.m. por cinco minutos e desprezar o sobrenadante;
13. Repetir duas vezes o passo anterior;
14. Secar o tubo na estufa a 60°C;
15. Ressuspender em 30 µL de água ultra pura.

**ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**

*Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1360 da Pesquisadora Ana Rachel Oliveira de Andrade intitulado "Leishmaniose em Ponta Porã: identificação da fauna flebotomínea e prevalência de casos humanos e caninos", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 26 de março de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos*

*Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 30 de março de 2009.*

