

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios na área urbana de Nova Andradina-MS e infecção natural por *Leishmania*

Jhoy Alves Leite

Dourados-MS
Março-2015

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Jhoy Alves Leite

FAUNA FLEBOTOMÍNEA DE FRAGMENTOS DE MATA E
PERIDOMICÍLIOS NA ÁREA URBANA DE NOVA ANDRADINA-MS E
INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Entomologia

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati
Co-orientador: Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes

Dourados-MS
Março-2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L533f	<p>Leite, Jhoy Alves. Fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios na área urbana de Nova Andradina-MS e infecção natural por <i>Leishmania</i>. / Jhoy Alves Leite. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 55f.</p> <p>Orientador: Prof. Dra. Eunice Aparecida Bianchi. Co-orientador: Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Leishmanioses. 2. Flebotomíneos. 3. Infecção natural. I. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

**"FAUNA FLEBOTOMÍNEA DE FRAGMENTOS DE MATA E PERIDOMICÍLIOS NA
ÁREA URBANA DE NOVA ANDRADINA-MS E INFECÇÃO NATURAL POR
Leishmania"**

Por

JHOY ALVES LEITE


Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Prof. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati
Orientador - USP



Prof. Dra. Herlinda Coeto Neitzke Abreu
Membro Titular - UFGD



Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Membro Titular - UFGD



Prof. Dr. Vânia Lúcia Brandão Nunes
Membro Titular - ANHANGUERA/UNIDERP

Aprovada em: 13 de março de 2015.

Biografia do Acadêmico

Jhoy Alves Leite, nascido em Dourados-MS em 14/06/1981, filho de Inês Alves Leite e Silas Soares Leite. Coursou o ensino fundamental na Escola Adventista e na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Presidente Tancredo Neves (1996). O ensino médio na Escola de 1º e 2º Graus Presidente Tancredo Neves e Escola Objetivo (1999) em Dourados-MS. A graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus de Dourados (2006). Desde 2007 atua na função de biólogo no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Nova Andradina-MS realizando pesquisas, orientação aos municípios e ações de vigilância, prevenção e controle de zoonoses e de acidentes causados por animais peçonhentos, de relevância para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Quero dizer que alguém pode fazer algo sozinho, porém, trabalhar em conjunto é muito melhor, é especial, é divino, e assim foi neste trabalho, por isso agradeço-lhes.

Agradeço a todos os *professores* pela companhia, motivação e cobranças.

Agradeço a todos os *colegas da Entomologia*, juntos estudamos, conversamos, trabalhamos, viajamos, enfim, por todos os momentos.

Agradeço à *Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais* (FCBA) e ao *Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade* representados na pessoa do Prof. Dr. Manoel Araújo Uchôa-Fernandes e Marcelo Cardoso Oliveira pela oportunidade deste aprendizado e por toda atenção e gentileza nos atendimentos.

Agradeço ao Secretário Municipal de Saúde de Nova Andradina-MS, na pessoa do Sr. *Silvio Carlos Senhorini* pela compreensão durante todo este período de dois anos.

Agradeço a todos os *funcionários do Centro de Controle de Zoonoses* (CCZ) de Nova Andradina-MS, que me apoiaram incentivando, anotando recados, auxiliando, emprestando veículo: Célia, Dulci, Gabriela, Joelma, Marcelo e Roseli.

Agradeço e dedico à toda equipe pela atenção, dedicação, conselhos, correções, compreensão em todos os momentos: *Me. Kleiton Maciel dos Santos, Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão, Profa. Dra. Herintha Coeto Neitzke-Abreu e Dra. Magda Freitas Fernandes*, carinho especial por todos, vos admiro.

Agradeço ao co-orientador *Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes*, que tem me apoiado desde a graduação, a quem admiro.

Agradeço à orientadora *Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati*, que a admirava mesmo antes de iniciarmos esta parceria, e agora mais pela atenção, carinho, compreensão, conhecimento, simplicidade ofertada a mim e a todos que pude ver.

Agradeço a todos os *meus parentes e aos que considero como tal*, que sempre me incentivaram a continuar e me apoiaram em vários momentos.

Deixo a formalidade em muitos momentos utilizada, para agradecer aos meus pais *Inês Alves Leite e Silas Soares Leite* que, mesmo falecidos quando iniciei o mestrado, sempre estiveram em minha memória contribuindo para que continuasse. Sempre serão meus exemplos do aperfeiçoamento, de luta, de fazer história.

Agradeço à minha amada esposa, *Rosenilda da Silva Alves Leite*, que me fez acreditar que poderia, mesmo quando o estresse e as tantas responsabilidades me diziam o contrário, e

por todos os outros momentos juntos, pela compreensão e paciência, quando eu ficava vários dias em Dourados, com as emoções à flor da pele. Eu te amo minha querida!

Agradeço definitivamente a **DEUS**, por dar-me o sopro da vida a cada dia, o ânimo. Agradeço a proteção contra animais peçonhentos, onça e outras ameaças percebidas ou não. Pela esperança, força, tudo oferecido mesmo quando eu não mereço; muito obrigado!

Dedicatória

A Deus, aos meus pais (*in memoriam*) e
aos amigos.

SUMÁRIO

Biografia do acadêmico	iv
Agradecimentos	v
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Vetores	3
2.2 Leishmanioses	5
2.3 Agentes etiológicos	6
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivo Específicos	10
4 HIPÓTESES	11
5 MATERIAIS E MÉTODOS	12
5.1 Área de Estudo	12
5.2 Coleta de Flebotomíneos	13
5.3 Dissecção e Identificação dos Flebotomíneos	13
5.4 Análise Molecular das Fêmeas de Flebotomíneos	14
5.4.1 Extração do DNA de Flebotomíneos	15
5.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	15
5.4.3 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) .	16
5.5 Análise Populacional	16
5.6 Dados Climáticos	17

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1 Fauna Flebotomínea	18
6.2 Infecção natural	24
6.2.1 Exame Parasitológico	24
6.2.2 Análise molecular - PCR-RFLP	25
7 CONCLUSÃO	29
8 REFERÊNCIAS	31-41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estado de endemicidade da leishmaniose visceral em 2012	08
FIGURA 2. Estado de endemicidade da leishmaniose tegumentar em 2012	09
FIGURA 3. Pontos (1 a 18) de coleta de espécimes de flebotomíneos em três fragmentos de mata e peridomicílios no município de Nova Andradina-MS	12
FIGURA 4. Acumulado mensal da precipitação pluviométrica (mm), temperatura (°C) e distribuição mensal dos números totais das espécies: <i>Br. brumpti</i> , <i>Sc. sordellii</i> , <i>Pi. christenseni</i> , <i>Ev. lenti</i> , <i>Ny. neivai</i> , <i>Pa. aragaiói</i> e <i>Ev. cortelezzi</i> , no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015	20
FIGURA 5. Características dos fragmentos de mata: Mata A (A1 e A2), Mata B (B1, B2, B3 e B4) e da Mata C (C1 e C2)	23
FIGURA 6. Imagens de nematóides presentes em flebotomíneos fêmeas quando dissecadas	25
FIGURA 7. Produtos amplificados pela técnica de PCR seguida de Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ITS 1 (RFLP) com a enzima <i>Hae</i> III. Colunas: controles positivos: La = <i>L. (L.) amazonensis</i> ; Lb = <i>L. (V.) braziliensis</i> ; Li = <i>L. (L.) infantum</i> . C- = controle negativo. M = marcador molecular de 100 pb. Amostras: 14 e 27 = <i>Pi. christenseni</i> (positivas para <i>Leishmania</i> spp.); 29 = <i>Ev. lenti</i> e 40 = <i>Sc. sordellii</i> (positivas para <i>L. (L.) amazonensis</i>); 41 = <i>Sc. sordellii</i> (positiva para <i>Leishmania</i> spp.) e 52 = <i>Ev. teratodes</i> (positiva para <i>L. (L.) amazonensis</i>)	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015; Nova Andradina, Mato Grosso do Sul, Brasil	19
TABELA 2. Número absoluto, índice de Shannon-Wiener, índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) e frequência de machos e fêmeas de flebotomíneos em fragmentos de mata e peridomicílios, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015; Nova Andradina, Mato Grosso do Sul, Brasil	21
TABELA 3. Número absoluto de fêmeas de cada espécie positiva para o gênero <i>Leishmania</i> , no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015	25
TABELA 4. Número de fêmeas de flebotomíneos submetidas à análise molecular para investigação da presença de DNA de <i>Leishmania</i> e frequência de positividade segundo a espécie de <i>Leishmania</i>	26

FAUNA FLEBOTOMÍNEA DE FRAGMENTOS DE MATA E PERIDOMICÍLIOS NA ÁREA URBANA DE NOVA ANDRADINA-MS E INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*

RESUMO

Os flebotomíneos, com ampla distribuição mundial, constituem um grupo de insetos de grande importância na saúde pública, cujas fêmeas estão envolvidas na transmissão de *Leishmania*, agentes das leishmanioses tegumentar e visceral. Esses insetos são encontrados com frequência em fragmentos de matas, onde habitats naturais favorecem a manutenção do ciclo de vida desses vetores na natureza. No município de Nova Andradina, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil tem sido notificados vários casos de leishmaniose tegumentar. O objetivo deste estudo foi conhecer a fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios em área urbana e investigar a presença de espécies infectadas naturalmente por *Leishmania*. Os insetos foram coletados de novembro de 2013 a janeiro de 2015; utilizando-se armadilhas luminosas, tipo CDC distribuídas em três fragmentos de matas e peridomicílios adjacentes a estes, em área urbana de Nova Andradina. Foi realizado exame parasitológico para pesquisa de flagelados e análise molecular para identificação da espécie de *Leishmania*. Foram coletados 302 espécimes de flebotomíneos; 101 machos e 201 fêmeas. A fauna flebotomínea constituiu-se de seis gêneros e 11 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortelezzi*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia teratodes*, *Evandromyia termitophila*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia aragoi*, *Psathyromyia bigeniculata*, *Psathyromyia campograndensis*, *Pintomyia christenseni* e *Sciopemyia sordellii*. Dentre as espécies assinaladas, *Ny. neivai* é a única com importância na transmissão de agentes da leishmaniose tegumentar no Sudeste e Sul no Brasil, Paraguai e Argentina, e pode estar associada aos casos ocorridos em Nova Andradina-MS. *Br. brumpti* foi a espécie mais abundante e presente nos peridomicílios juntamente com *Ev. lenti*, *Ev. termitophila*, *Ny. neivai* e *Pi. christenseni*. Os espécimes foram coletados em quase todos os meses e verificou-se o aumento na abundância de indivíduos em períodos chuvosos e maior riqueza das espécies *Br. brumpti*, *Sc. sordellii*, *Pi. christenseni* e *Ev. lenti* em períodos com alta precipitação pluviométrica. Das 106 fêmeas dissecadas e acondicionadas em 55 pools, detectou-se a presença de DNA de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* pela PCR seguida da análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, em um pool de cada uma das espécies: *Ev. lenti*, *Ev. teratodes* e *Sc.*

sordellii, assim como de DNA de *Leishmania* spp., em dois pools de *Pi. christenseni* e um de *Sc. sordellii*; resultando, portanto, em uma taxa de infecção mínima de 5,66% para cada uma das leishmânias.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmanioses, Flebotomíneos, Infecção natural.

**SANDBLY FAUNA OF FLOREST FRAGMENTS
AND PERIDOMICILE IN URBAN AREA OF NOVA ANDRADINA-MS
AND NATURAL INFECTION BY *Leishmania***

ABSTRACT

The sand flies are widely distributed throughout the world. This insect group is of great interest in public health because their females are involved in the transmission of *Leishmania*, agents of cutaneous and visceral leishmaniasis. Forest fragments favor the maintenance of the life cycle of both, vector and agent, in nature. In Nova Andradina municipality, Mato Grosso do Sul state, Brazil, some cases of cutaneous leishmaniasis (CL) have been notified. So the goal of this study was to identify the sand fly fauna and investigate the presence of species naturally infected by *Leishmania* of urban forest fragments and peridomiciles close to them in Nova Andradina. The insects were captured from November 2013 to January 2015, using CDC light traps distributed in three urban forest fragments. Parasitological examination was performed to investigate flagellates in sand fly guts and Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for identification of *Leishmania* spp. A total of 302 sand flies were captured (101 males and 201 females) of six genus and 11 species: *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia teratodes*, *Evandromyia termitophila*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia aragoi*, *Psathyromyia bigeniculata*, *Psathyromyia campograndensis*, *Pintomyia christenseni* and *Sciopemyia sordellii*. Only *Ny. neivai* is recognized as vector of cutaneous leishmaniasis agents in Southeast and South Brazilian regions, Paraguay and Argentina. Thus it may be linked to cases in Nova Andradina-MS. *Br. brumpti* was the most abundant and present in peridomiciles along with *Ev. lenti*, *Ev. termitophila*, *Ny. neivai* and *Pi. christenseni*. Although specimens were collected in nearly every month, their highest frequencies occurred during rainy periods, mainly for *Br. brumpti*, *Sc. sordellii*, *Pi. christenseni* and *Ev. lenti*. Of the 106 females dissected and placed in 55 pools, the presence *Leishmania (Leishmania) amazonensis* DNA was detected by PCR-RFLP in three species: *Ev. lenti*, *Ev. teratodes* and *Sc. sordellii*, as well as of *Leishmania* spp. in two females of *Pi. christenseni* and one of *Sc. sordellii*, resulting in a minimum infection rate of 5.66% for each taxon of *Leishmania*.

KEY-WORDS: Leishmaniasis, Sandflies, Natural infection.

1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são os vetores de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e numerosos arbovírus (SHERLOCK 2003). As leishmanioses, antropozoonoses causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) dentre as seis doenças tropicais mais impactantes em saúde pública sendo, depois da malária, a segunda em importância, infectando cerca de 14 milhões de pessoas em todo o mundo e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (WHO 2014). As leishmanioses ainda estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo, afetando em grande parte as populações mais pobres, principalmente nos países em desenvolvimento. No Continente Americano, a distribuição dessas parasitoses se estende desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (WHO 2014). No Brasil, casos autóctones de leishmaniose tegumentar (LT) são assinalados em todos os Estados e de leishmaniose visceral (LV), na maioria deles. Em Nova Andradina, Mato Grosso do Sul (MS) não há notificação de casos humanos de LV, porém, entre 2001 e 2014 foram notificados 33 casos de LT, sendo dez autóctones e 23 importados (SINAN/SMS 2015). O aumento na ocorrência dessas zoonoses vem sendo registrado em decorrência de mudanças ambientais, resultantes das atividades humanas, com modificação do perfil epidemiológico tanto em áreas onde a transmissão é florestal, como em focos enzoóticos naturais e em áreas onde a transmissão é periurbana envolvendo reservatórios domésticos (SHAW 2002, BRASIL 2007).

Os flebotomíneos são encontrados com frequência em ecótopos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e cavernas (GALATI et al. 2003a, 2003b, 2006), bem como, em ambientes rurais e urbanos, próximos a habitações humanas e animais domésticos, demonstrando que se encontram em processo de adaptação (TOLEZANO et al. 2001, BARATA et al. 2004). Isto vem ocorrendo devido à diminuição das matas nativas, com alterações dos habitats naturais e restrição dos ambientes utilizados por esses vetores (TOLEZANO et al. 2001). Em muitos casos as doenças transmitidas por vetores estão relacionadas à presença de florestas. A destruição destas florestas pode levar à eliminação de patógenos e vetores relacionados a certas doenças, ou pode forçar a adaptação destes animais a outros ambientes que não necessariamente as florestas (APARÍCIO 2001). Essas alterações ambientais ocasionadas pelo homem também levaram à dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos

flebotomíneos e conseqüentemente contribuindo para a ocupação de diferentes ambientes, inclusive o antrópico (GOMES et al. 1989, MARZOCHI 1989).

Os flebotomíneos tendem a não se afastar muito dos seus criadouros ou locais de abrigo. Embora a maioria não vá além dos 250 metros, podendo ser capturados até cerca de um quilômetro do ponto de soltura (MORRISON et al. 1993, CASANOVA et al. 2005). Segundo FORATTINI (1973), DOURADO et al. (1989), GOMES et al. (1989), MIRANDA et al. (1996), CORTE et al. (1996) e COSTA (2001), o alcance de voo dos flebotomíneos pode variar entre 200 e 1.000 metros. Estudos realizados no Sul do Brasil e no Peru mostraram que os flebotomíneos se dispersam de 200 a 500 metros, todavia existem registros de até 1.500 metros na Rússia. No entanto, a pequena capacidade de dispersão desses insetos não os impede do contato com humanos que têm o hábito de construir suas habitações próximas às matas (FORATTINI 1973).

Desse modo, as espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (FORATTINI 1973, OLIVEIRA et al. 2006). Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um risco constante como vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos (BARBOSA et al. 1999, BRASIL 2007). Essa proximidade do homem a zonas de mata e a criação de animais domésticos tem atraído um grande número de espécies de flebotomíneos (MISSAWA et al. 2008), aumentando a probabilidade de transmissão de parasitas para o homem conforme aumenta a proximidade de suas habitações aos habitats desses insetos (FORATTINI 1973).

O conhecimento da fauna de flebotomíneos em fragmentos de matas é importante para verificar a presença ou ausência de espécies incriminadas da transmissão das leishmanioses, principalmente quando estão próximos de áreas residenciais, que pode favorecer o risco de transmissão destas zoonoses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vetores

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae (FORATTINI 1973), conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL 2007), onde o conhecimento sobre esses dípteros está associado tanto a áreas rurais quanto urbanas (NUNES et al 1995, GALATI et al 1996, 2006, OLIVEIRA et al 2001, 2003, ALMEIDA et al 2010).

São insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm que apresentam em seu corpo intensa pilosidade (BRAZIL e BRAZIL 2003). O aspecto hirsuto, devido ao revestimento constituído principalmente por cerdas finas e longas, quando recebem luz incidente refletem tonalidade clara ou amarelada. Essa é a principal origem da denominação popular de “mosquito palha”. São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento ao voar em pequenos saltos sobre a superfície e pousar com as asas entreabertas (FORATTINI 1973).

Na fase imatura desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa, porém, na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes. O ciclo biológico holometábolo dos flebotomíneos processa-se no ambiente terrestre. O ciclo se completa quando as posturas são realizadas em criadouros ricos em matéria orgânica, calor, umidade e ao abrigo da luz (CIMERMAN e CIMERMAN 1999). O desenvolvimento de ovo ao inseto adulto é de aproximadamente 30 a 40 dias (BRASIL 2009). A longevidade dos adultos em condições naturais é praticamente desconhecida, mas observações em laboratório indicam que os machos e fêmeas podem sobreviver entre 20 a 30 dias (BRAZIL e BRAZIL 2003).

Machos e fêmeas adultos se alimentam de seiva vegetal, e particularmente as fêmeas praticam a hematofagia em várias classes de vertebrados (CHANOTIS 1974, AZEVEDO et al. 2011). A atividade hematofágica é predominantemente noturna, porém, pode exercê-la durante o dia, principalmente em ambientes com pouca luminosidade como cavernas e áreas florestais (GOMES et al. 1989, GALATI et al. 2003a, 2003b, 2006). Ambos os sexos, durante o dia, se refugiam em abrigos naturais ou artificiais.

O sangue de vertebrados promove a maturação dos oócitos, portanto, parte dos estímulos para a oviposição (READY 1979). Decorridos três e oito dias após o repasto sanguíneo, dezenas de ovos são ovipostos pela fêmea em local úmido e protegido da luz. A autogenia ocorre em algumas espécies. Embora seja pouco conhecida a relação entre a

hematofagia e a postura de um lote de ovos, a concordância gonotrófica parece menos marcada que nos culicídeos (MARCONDES 2011). Em média as fêmeas põem de 40 a 70 ovos (CIMERMAN e CIMERMAN 1999).

O acasalamento dos flebotomíneos ocorre durante o período de maior atividade na natureza, o noturno. Associa-se a este comportamento o ato de vibrar as asas, e para várias espécies, a atração entre os sexos pode ocorrer por meio de feromônios liberados por glândulas terciais do abdômen de machos (BRAZIL e BRAZIL 2003).

As picadas de flebotomíneos são incômodas, principalmente, quando numerosas. Podem ser muito dolorosas, tendo sido comparadas ao toque de uma agulha em brasa e causar eritema, que clareia quando comprimido com o dedo (MARCONDES 2011).

Embora os flebotomíneos possam transmitir vários agentes, a sua maior importância em termos de saúde pública se deve ao seu papel como vetores dos protozoários do gênero *Leishmania*. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* (BRASIL 2006).

São quatro os critérios essenciais sugeridos para apontar efetivamente uma determinada espécie de flebotomíneo como vetora de leishmânias: A) antropofilia; B) distribuição espacial em concordância com a ocorrência dos casos de infecção humana; C) infecção natural por parasitas identificados como pertencentes à mesma espécie de *Leishmania* que infecta o homem; D) atração por mamíferos reservatórios de *Leishmania*. Somam-se dois os critérios complementares: E) os exemplares experimentalmente infectados com *Leishmania* devem manter, em laboratório, todas as etapas do desenvolvimento parasitário; F) a capacidade desses flebotomíneos de se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasita, através da picada, de hamster para hamster (KILLICK-KENDRICK e WARD 1981, KILLICK-KENDRICK 1990, BRAZIL 2007).

Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição mundial, sendo mais abundantes em meses mais quentes e chuvosos (REBÊLO 2001, SARAIVA et al. 2006, CELLA et al. 2011). Atualmente existem quase mil espécies descritas no mundo, das quais cerca de 500 ocorrem na região Neotropical (SHIMABUKURO e GALATI 2011). No Brasil 284 espécies estão descritas (AGUIAR e MEDEIROS 2003, GALATI 2003), sendo 63 delas encontradas no Estado de Mato Grosso do Sul (GALATI et al. 1996, 2003a, 2003b, 2006, 2010, OLIVEIRA et al. 2001, 2003) e 12 no município de Nova Andradina (ALMEIDA et al. 2013).

No Brasil, considera-se como transmissores de *Leishmania* spp. associadas à leishmaniose tegumentar (LT) as espécies *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*,

Nyssomyia intermedia, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia anduzei*, *Pintomyia pessoai*, *Pintomyia fischeri*, *Psychodopygus wellcomei*, *Psychodopygus squamiventris*, *Psychodopygus paraensis*, *Psychodopygus ayrozai*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Bichromomyia flaviscutellata* e *Bichromomyia olmeca* (BRASIL 2007, GAMA NETO 2010, RANGEL e LAINSON 2009) e da *Leishmania infantum chagasi* associada à LV as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL 2006).

2.2 Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses, denominadas de LT quando acomete a pele e mucosas, e LV quando atinge órgãos internos (FIOCRUZ 2013).

Segundo a WHO (2014) estas doenças afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, e estão associadas à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico deficiente e falta de recursos. Em recente análise mostra que mais de 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses e que as doenças estão ligadas a mudanças ambientais, como o desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e de urbanização.

Estimativa aponta cerca de 1,3 milhões de casos anuais de LV com 20 e 30 mil mortes no mundo. Mais de 90% dos novos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A distribuição mundial da LV no ano de 2012 pode ser vista na Figura 1 (WHO 2014a). Estima-se que cerca de 95% dos casos de LT ocorram nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo e no Oriente Médio na Ásia Central, e que mais de 2/3 dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iran (República Islâmica) e República Árabe da Síria (WHO 2014). A distribuição mundial da LT no ano de 2012 é apresentada na Figura 2 (WHO 2014b).

Os números de casos nos anos 2011, 2012 e 2013 da LV no Brasil ultrapassaram três mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014); no Estado de MS os números foram respectivamente 273, 330 e 238 (SINAN/SES 2015), e no município de Nova Andradina não há registro de casos de LV (SINAN/SMS 2015). Já os números da LT nos anos 2011, 2012 e 2013 no Brasil foram 21.981, 23.547 e 18.226 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014a). No Estado de MS foram 116, 162 e 152 (SINAN/SES 2015), e no município de Nova Andradina no período de 2001 a 2015 foram registrados 10 casos autóctones (SINAN/SMS 2015).

A LT caracteriza-se como doença infecciosa e não contagiosa. É causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e mucosas.

Primariamente afeta animais. O ser humano pode ser envolvido secundariamente. No Brasil, é uma das afecções dermatológicas que merece atenção, devido à sua magnitude e risco de provocar deformidades no ser humano, ocasionando problemas psicológicos, com reflexos no campo social e econômico, podendo ser considerada na maioria dos casos uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL 2007). É classificada como leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LC é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele (GONTIJO e CARVALHO 2003). A LM também denominada espúndia, na quase totalidade dos casos acometem a mucosa nasal, com importante comprometimento do septo, seguindo-se em ordem de frequência o envolvimento da mucosa oral, com risco de deformidades permanente em ambos os casos (GONTIJO e CARVALHO 2003, GREVELINK e LERNER 1996, PEARSON e SOUSA 1996). A LCD é caracterizada por lesões múltiplas, geralmente ulceradas, distribuídas por diversas áreas do tegumento, distantes do sítio de inoculação primária (GONTIJO e CARVALHO 2003, MARZOCHI e MARZOCHI 1994).

A LV é uma doença crônica grave e sistêmica; Apresenta alta letalidade quando não tratada (GONTIJO e MELO 2004, PELISSARI et al. 2011), e é considerada entre as doenças negligenciadas no Brasil (MALAFAIA et al. 2010). A LV é caracterizada clinicamente suspeita pela presença de febre e esplenomegalia associada ou não à hepatomegalia. A evolução clínica da LV é dividida em período inicial, de estado e final (BRASIL 2006).

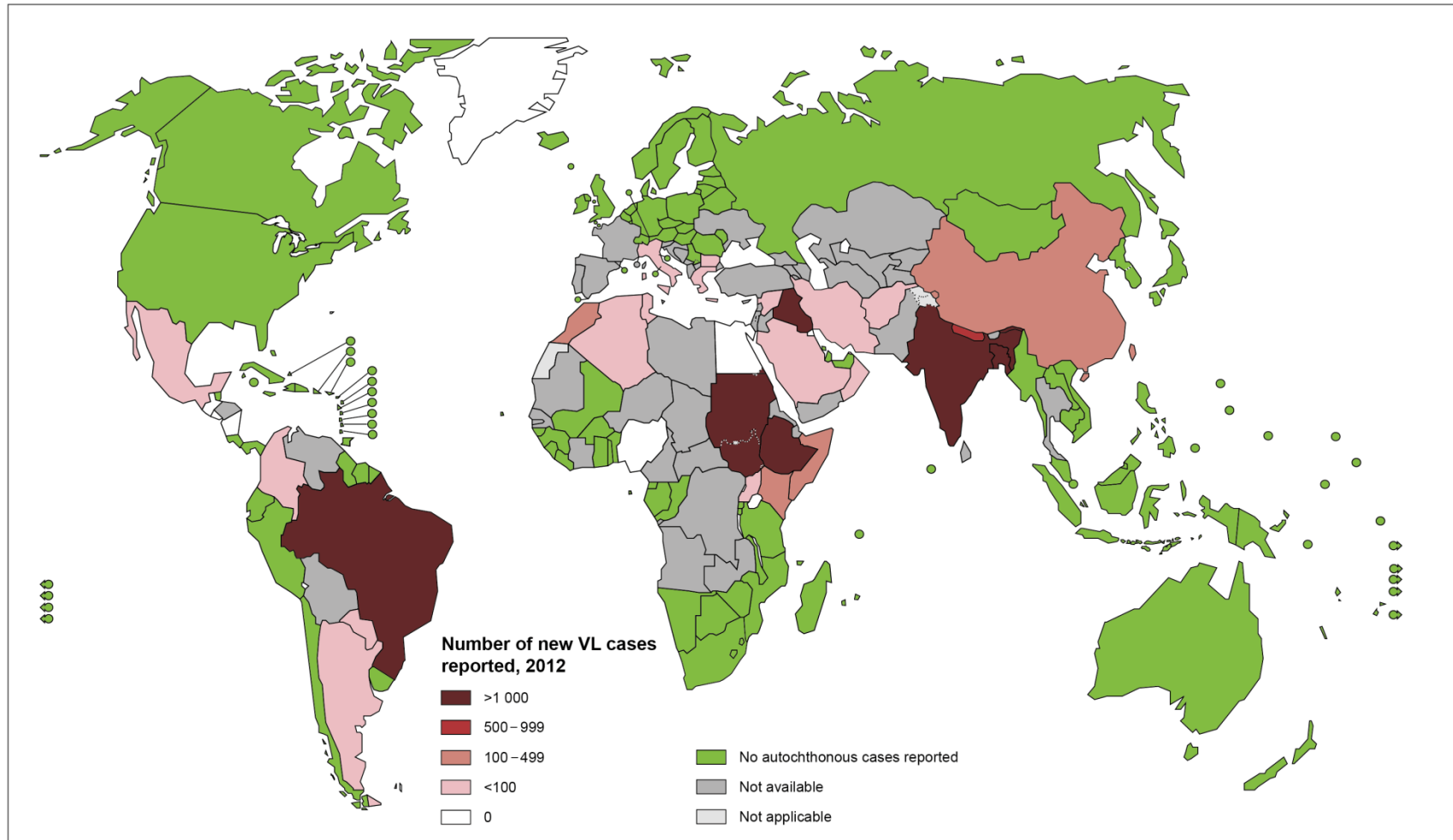
2.3 Agentes Etiológicos

As leishmanioses são doenças infecciosas que têm como agentes etiológicos protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (DESJEUX et al. 2004). As leishmânias estão agrupadas em dois subgêneros na América, *Leishmania* e *Viannia* (GRAMICCIA e GRADONI 2005).

Várias espécies são descritas no mundo. As espécies conhecidas como causadoras da LT no Brasil são sete: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi* (BRASIL 2007). A causadora da LV no Brasil é a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (BRASIL 2006).

MARCONDES (2011) defende que a distribuição das espécies de *Leishmania* deve ser bem mais ampla que a conhecida, que em geral se baseia apenas no encontro de casos humanos; e que há várias espécies pouco conhecidas que não infectam (ainda) humanos.

A transmissão da *Leishmania* num local depende muito das condições ambientais, as quais em decorrência de modificações pode provocar tanto a substituição do parasita que atinge os humanos quanto dos flebotomíneos envolvidos, nessas condições. O ciclo de transmissão de algumas espécies de *Leishmania* pode, do mesmo modo que ocorre com certas arboviroses, envolver mais de um vetor (MARCONDES 2011, LAINSON e SHAW 2005).

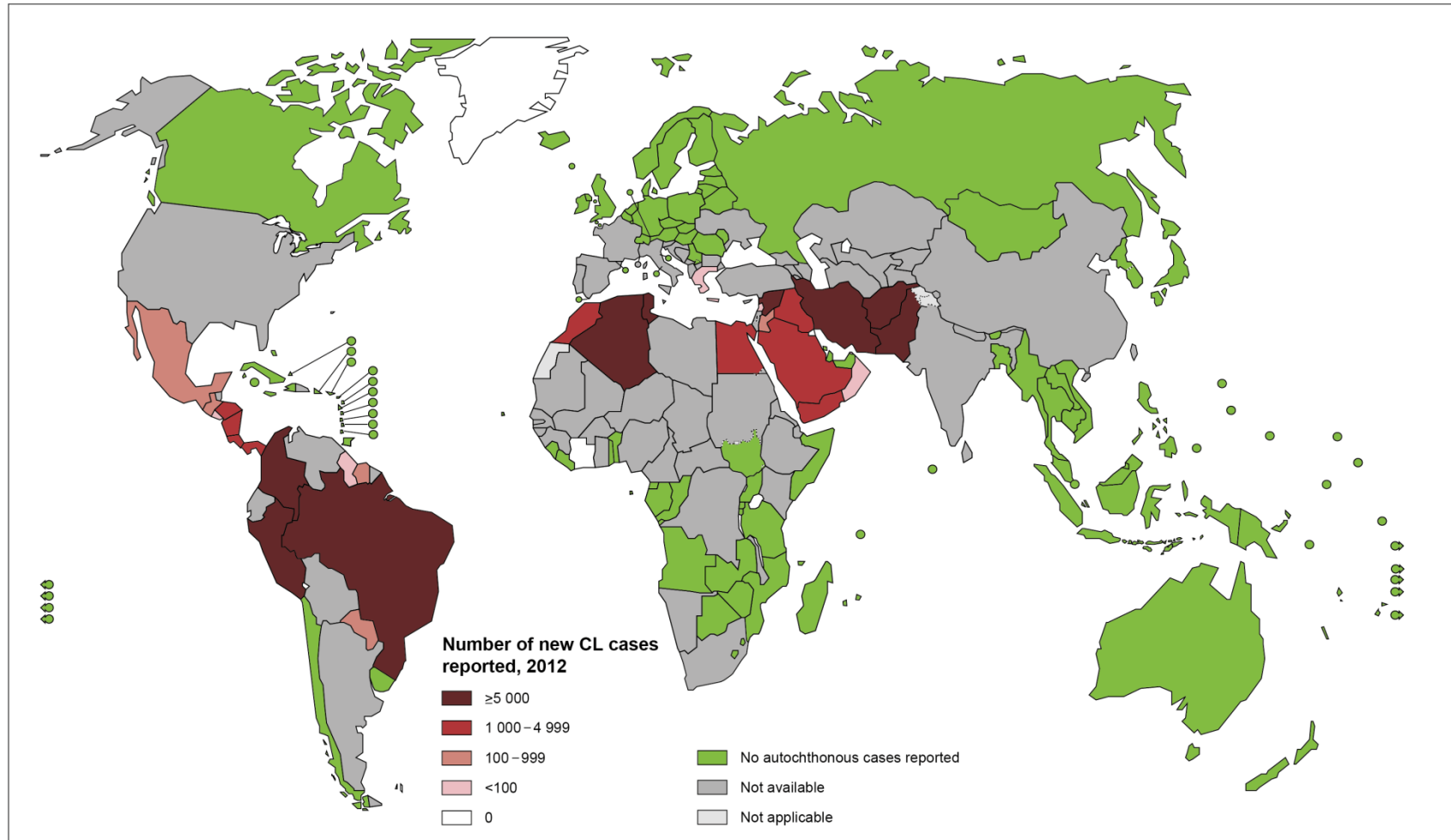


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1. Estado de endemidade da leishmaniose visceral em 2012 (WHO 2014a).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 2. Estado de endemidade da leishmaniose tegumentar em 2012 (WHO 2014b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a fauna flebotomínea e a presença de espécies infectadas por *Leishmania* spp. em três fragmentos de matas e peridomicílio próximos a estes, em área urbana de Nova Andradina-MS.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar a fauna flebotomínea em ambiente silvestre e antrópico e conhecer quais as espécies de flebotomíneos apresentam comportamento silvestre e antrópico;

Avaliar a abundância e diversidade das espécies;

Observar a variação mensal das espécies;

Pesquisar flagelados por microscopia;

Investigar a presença de possíveis vetores;

Investigar a infecção natural por *Leishmania* pela Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Polimorfismo pelo tamanho do fragmento de Restrição (PCR-RFLP)

Caracterizar as espécies de *Leishmania* pela PCR-RFLP.

4 HIPÓTESES

O presente estudo procurou avaliar em relação à fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios em área urbana do município de Nova Andradina-MS as seguintes hipóteses:

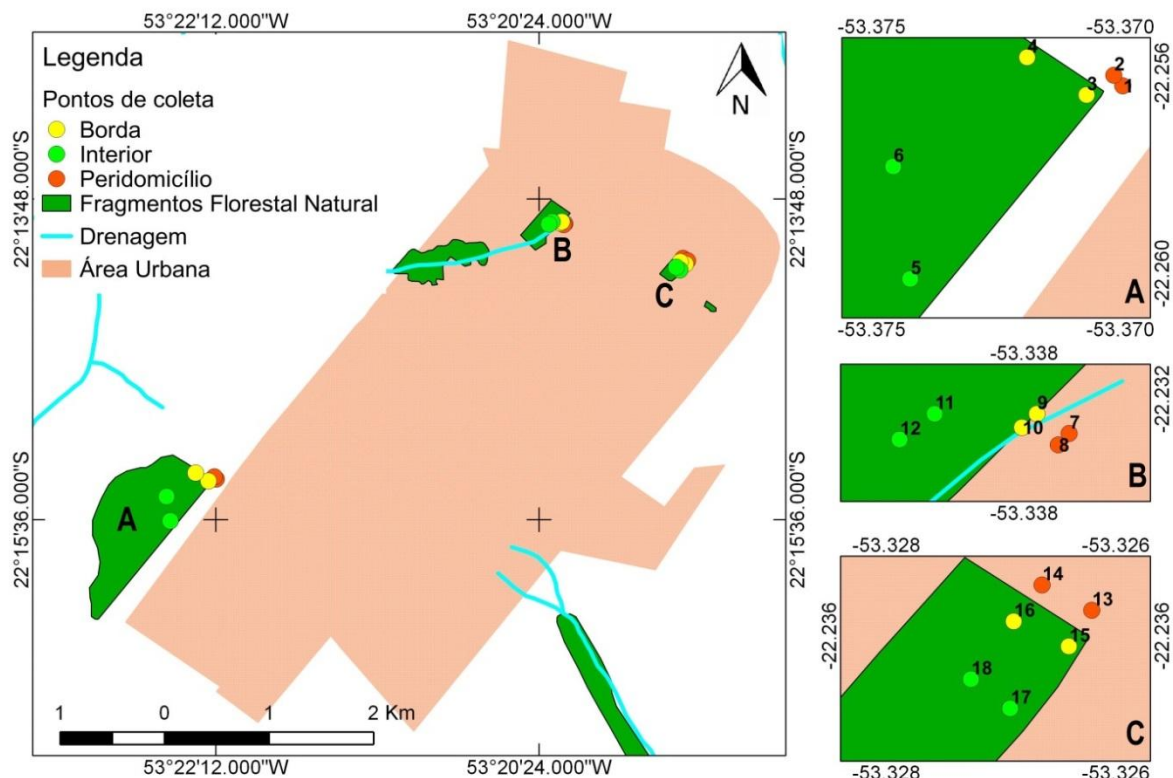
- A diversidade de espécies é maior que a registrada em estudo anterior
- A presença e abundância das espécies no ambiente de mata e antrópico corroboram com o resultado anterior
- Há espécies que se destacam em ambiente antrópico
- Existem períodos mais propícios para a abundância das espécies
- Os fragmentos de mata diferenciam-se em relação à diversidade e abundância das espécies
- Espécies vetoras de *Leishmania* estão presentes
- Há espécies infectadas naturalmente por *Leishmania* spp.
- Há presença de espécies de *Leishmania* causadoras de LT e LV.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Área de Estudo

A pesquisa foi conduzida na sede municipal de Nova Andradina ($22^{\circ}14'00''$ S e $53^{\circ}20'35''$ O), que apresenta altitude aproximada de 380 metros e distante 288 km de Campo Grande, capital de Mato Grosso do Sul (MS). Possui uma área estimada em 4.776,002 Km² que representam uma extensão de 1,34% do Estado e população de 45.585 habitantes. Pertence à Bacia do Rio Paraná, caracterizado pelo Bioma Cerrado e Mata Atlântica (IBGE 2011).

O levantamento da fauna flebotomínea foi realizado em área urbana, em três fragmentos de mata: mata A localizada na Fazenda São Miguel da Catequesi próxima ao Bairro Argemiro Ortega; a mata B que é a Mata Municipal localizada próxima ao Bairro Cohab III e mata C localizada na Estância Santa Clara próxima ao Bairro Portal do Parque (Figura 3).



Projeção Cartográfica:UTM. Datum: WGS84. Escala: 1:100000 Elaboração da Imagem: Chun Pu Hung, Bacharel em Gestão Ambiental.

Figura 3. Pontos (1 a 18) de coleta de espécimes de flebotomíneos em três fragmentos de mata e peridomicílios no município de Nova Andradina-MS.

Utilizou-se para a produção da Figura 3 Imagens de satélite Landsat-8, sensor OLI, com o emprego da banda pancromática, datada de 21 de agosto de 2014; e os dados digitais Shp disponíveis pelos órgãos públicos, como no caso do limite do município e área urbana pelo IBGE e drenagem do IMASUL.

As três áreas são fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual. Na mata A com área aproximada de 95.42 hectares ocorre a presença de gambás, macacos-prego, veados, onças, porcos-espinho, tatus, lagartos, serpentes e pássaros. No peridomicílio estão presentes galináceos e cães. O galinheiro fica cerca de 105 metros do limite da mata e a residência mais próxima está a 119 metros do limite da mata e a 64 metros do galinheiro.

A mata B possui área aproximada de 10.69 hectares. Os animais observados em seu interior são quatis, macacos-prego, tatus, pássaros e lagartos. No peridomicílio há a presença de cães. As residências mais próximas ficam aproximadamente 45 metros do limite da mata.

A mata C tem uma área aproximada de 3.57 hectares. Em seu interior presencia-se macacos-prego, tatus, lagartos e pássaros, e cães no peridomicílio. Cerca de 70 a 80 metros estão as residências mais próximas.

5.2 Coleta de Flebotomíneos

As coletas foram feitas no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015, uma vez por mês, das 17h às 8h, totalizando 4.320 horas. Foram utilizadas armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC (NATAL et al. 1991), na altura de 0,80 a 1,5 metros. Buscando aumentar a densidade e número de espécimes, no mês de janeiro de 2015 foram amostradas duas noites seguidas em cada área de estudo. Em cada fragmento de mata foram instaladas duas armadilhas no peridomicílio, duas na borda do fragmento (a 5 metros do limite da mata adentro) e duas no interior do fragmento, totalizando 18 pontos de coletas.

5.3 Dissecção e Identificação dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos coletados foram separados por sexo. Os machos foram clarificados e montados em bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula no Laboratório de Entomologia (LABENT) do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Nova Andradina-MS. A clarificação dos machos foi realizada segundo técnica descrita por FORATTINI (1973), para posterior identificação da espécie de acordo com Galati (2014).

A dissecação das fêmeas e identificação das espécies foi realizada no Laboratório de Insetos Vetores (LIVE) do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

As fêmeas foram dissecadas segundo procedimento utilizado por JOHNSON, MCCONNELL, HERTIG (1963) e LAINSON (1997), como a seguir: colocaram-se duas gotas de solução salina sobre lâmina esterilizada; em uma delas colocou-se a fêmea, que sob microscópio estereoscópico e com auxílio de dois estiletes, teve o tórax fixado na lâmina e os segmentos terminais do abdômen na altura do 8º tergito separados. A seguir, com movimento de tração no 8º tergito, as espermatecas e todo o tubo digestório foram expostos. O restante do corpo foi transferido para outra gota de solução salina. O tubo digestório e a parte terminal do abdômen foi coberta com lamínula e examinada sob microscópio óptico, em aumento de 400X, para observação de protozoários flagelados e identificação da espécie de flebotomíneo, por meio das espermatecas. Quando necessário foram observadas estruturas nas antenas e cibário para auxiliar na identificação, segundo Galati (2014).

As fêmeas dissecadas e identificadas foram acondicionadas individualmente ou em *pools* de no máximo 10 indivíduos por espécie, considerando-se a data e ecótopo, em tubos tipo eppendorf com álcool isopropílico e conservadas sob refrigeração até a análise molecular para pesquisar a presença de *Leishmania*.

A nomenclatura adotada para identificação das espécies de flebotomíneos seguiu a padronização de GALATI (2003, 2014) e a abreviação dos gêneros, a de MARCONDES (2007).

5.4 Análise Molecular das Fêmeas de Flebotomíneos

A análise molecular das fêmeas selvagens de flebotomíneos foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR-), a fim de investigar a presença de DNA de *Leishmania*, seguido da identificação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorfism-RFLP-) com a enzima de restrição *Hae* III. A análise molecular foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

5.4.1 Extração do DNA de flebotomíneos

As amostras com fêmeas de flebotomíneos agrupadas individualmente ou em *pools* de 10 insetos por tubo em álcool isopropílico foram colocadas para secar em estufa a 50°C. Foi adicionado em cada tubo (1,5 mL) 300 µl da solução de resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories) a 5% e os insetos foram triturados com auxílio de pistilo de polipropileno (Pellet Pestles, azul, autoclavável). A solução foi misturada com ajuda de vortex por 15 segundos e posterior centrifugação por um minuto a 13.000 rpm. Foi colocado então em banho-maria a 90°C por 30 minutos e um spin no vortex; após mais uma centrifugação por um minuto. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo, devidamente autoclavado, e depois armazenado a -20°C durante pelo menos 12 horas para realização da PCR posteriormente.

5.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR teve como alvo uma região do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) para isso foram utilizados os seguintes iniciadores: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), segundo EL TAI et al. (2000).

Estes iniciadores flanqueiam a região ITS1 de tamanho estimado entre 300 a 350pb dependendo da espécie. As reações foram realizadas com volume final de 25µL: tampão 1X Invitrogen, dNTPs 0.2mM, MgCl₂ 1,5 mM, formamida 1µL (100%) iniciadores 10 pmol, Taq polimerase Phoeutria 5U/µL, DNA 5µL, água 13,25µL e termociclador BIO-RAD T100™ ThermalCycler. Os ciclos foram de 95°C - 3min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 55°C - 30 seg, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 5 min.

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto), com pós-extensão a 72°C por 5 minutos. Como controle negativo foi utilizado uma reação sem DNA e como controles positivos, cepas (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães de Recife-PE (CPqAM, FIOCRUZ-PE).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % e corados com gel red® e visualizados sob luz ultravioleta. Para tanto 8µL dos produtos amplificados foram homogeneizados com 2µL de solução de gel red e 3 µL de tampão e submetidos à corrida eletroforética a 110 volts, 400A por 90 minutos em tampão tris-borato

EDTA (TBE) 0,5x. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300nm.

5.4.3 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

Os produtos das PCRs foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Hae* III (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG ∇ CC....3' ou 3'....CC \blacktriangle GG....5'.

Para a caracterização das espécies de *Leishmania* envolvidas, os amplicons dessas PCR foram submetidos a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando a enzima de restrição *Hae* III (SCHÖNIAN et al 2003). Condições da RFLP: volume de 25 μ L, *Hae* III 1 μ L, tampão 10x 2 μ L, água estéril 5 μ L, amplicon 17 μ L, seguido de incubação a 37°C durante 3 horas. Em seguida os produtos de PCR-RFLP foram submetidos à corrida por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 3% com tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 100V e 400A por 90 minutos. Os géis foram corados com gel red (1X) e visualizados em luz ultravioleta.

5.5 Análise Populacional

Para analisar a abundância das espécies considerando-se todos os fragmentos de mata foi utilizado o índice de abundância de espécies (IAE), segundo ROBERTS e HSI (1979).

$$\text{IAE} = \frac{\mathbf{a} + \mathbf{RJ}}{\mathbf{K}}$$

Onde:

a = número de fragmentos de mata onde se fez coletas em que a espécie esteve ausente X C

C = maior valor obtido no *ranking* das espécies, segundo suas frequências em cada fragmento, considerando todos os fragmentos, + 1.

RJ = somatória das posições no *ranking* de cada espécie

K = número de fragmentos de captura

Convertendo-se os valores obtidos em IAE em uma escala entre zero e um obtém-se o índice de abundância de espécies padronizado (IAEP). Neste índice, o valor um ou mais próximo de um, corresponde à espécie mais abundante e o mais próximo de zero a menos abundante.

A fórmula para o cálculo de IAEP:

$$\mathbf{IAEP = \frac{C - IAE}{C - 1}}$$

Para análise de diversidade utilizou o índice de Shannon-Wiener (H') calculados pelo programa DivEs, Diversidade de espécies versão 3.0.

A fórmula para o cálculo do índice Shannon-Wiener (H'):

$$H' = - \sum_{i=1}^n pi \times \log_n pi$$

Onde: pi é a proporção da espécie em relação ao número total de espécimes encontrados nos levantamentos realizados, Logn = logaritmo natural (SHANNON 1948).

5.6 Dados Climáticos

Os dados climáticos de temperatura (°C) foram obtidos no interior dos fragmentos de mata utilizando termômetro, e a precipitação pluviométrica (mm) mensal acumulada, foi obtida junto ao Instituto Nacional de Meteorologia de Brasília (INMET), e Estação Climatológica de Ivinhema-MS.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fauna Flebotomínea

A fauna flebotomínea constituiu-se de seis gêneros e 11 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia teratodes*, *Evandromyia termitophila*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromomyia aragaoi*, *Psathyromomyia bigeniculata*, *Psathyromomyia campograndensis*, *Pintomyia christenseni* e *Sciopemyia sordellii*, além de indivíduos do gênero *Brumptomyia* que não puderam ser identificados em nível da espécie em virtude da perda de estruturas morfológicas necessárias para uma identificação segura. O estudo anterior apresentou uma diversidade de 12 espécies (ALMEIDA et al. 2013).

As espécies coletadas distribuem-se em três subtribos: 1) Lutzomyiina: *Ev. cortelezzii*, *Ev. lenti*, *Ev. termitophila*, *Pi. christenseni* e *Sc. sordellii*; 2) Psychodopygina: *Pa. aragaoi*, *Pa. bigeniculata*, *Pa. campograndensis* e *Ny. neivai*; 3) Brumptomyiina: *Br. brumpti*.

Foram coletados 302 espécimes de flebotomíneos, sendo 101 (33,44%) machos e 201 (66,56%) fêmeas.

O maior número de flebotomíneos coletados por mês foi de 23,18% (70) em janeiro/2015, seguido por 22,51% (68) em janeiro/2014, seguido por 13,24% (40) em abril/2014, 11,26% (34) em fevereiro/2014, 9,60% (29) em outubro/2014, 6,29% (19) em novembro/2014; e os demais meses abaixo de 6% (Tabela 1). Observou-se na distribuição mensal das espécies, que no mês com aumento na precipitação pluviométrica e no posterior, há uma tendência de aumento na abundância das espécies. O aumento no número de indivíduos ficou mais evidente nas espécies com maiores abundâncias: *Br. brumpti*, *Sc. sordellii*, *Pi. christenseni* e *Ev. lenti*. Porém, a presença de *Ny. neivai*, *Ev. cortelezzii* e *Pa. aragaoi*, mesmo que em número reduzido de indivíduos, ainda demarcou sua ocorrência em períodos chuvosos (Figura 4).

Os índices de diversidade foram maiores na mata A ($H' = 1,54$) seguido pela mata C ($H' = 0,98$) e mata B ($H' = 0,86$) (Tabela 2). A maior riqueza de espécies foi no fragmento de mata C (08) e mata A (08) seguida a menor na mata B (04) (Tabela 2). Assinala-se que mata C juntamente com a mata A são as que mais conservam suas características naturais e com menor impacto da ação humana. Os espécimes de flebotomíneos foram coletados em maior número no interior das matas, seguido da borda das matas e peridomicílios (Tabela 2), mostrando que ambientes com menor ação do homem atende as necessidades da maioria.

Brumptomyiina apresentou o maior número de espécimes, 166 (54,97%) (Tabela 2). O IAEP das espécies de flebotomíneos coletados nos três fragmentos de mata apresentou *Br. brumpti* como a mais abundante 0,96, seguida de *Sc. sordellii* 0,88 e *Pi. christenseni* 0,42 (Tabela 2).

Foi registrado pela primeira vez em Nova Andradina-MS a presença das espécies *Ev. cortelezii*, *Pi. christenseni*, *Pa. aragaoi* e *Pa. bigeniculata*.

Tabela 1. Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos capturados em ambiente de mata, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015; Nova Andradina, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Espécies	MATA A															TOTAL
	2013		2014												2015	
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	2	-	17	2	-	-	-	1	25	8	2	5	62
<i>Ev. lenti</i>	-	-	1	5	-	3	-	-	-	-	-	1	1	1	11	23
<i>Ev. termitophila</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5
<i>Ny. neivai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	3
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pa. campograndensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	3
<i>Pi. christenseni</i>	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	8	-	11	22
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	18	-	2	2	-	-	-	-	1	-	1	27	51
Subtotal			1	29		22	4	1			1	28	18	4	62	170
Espécies	MATA B															TOTAL
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	
	<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
<i>Ev. cortelezii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Ev. teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	4	11
Subtotal	-	-	-	-	5	3	-	-	-	-	-	1	-	-	6	15
Espécies	MATA C															TOTAL
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	
	<i>Br. brumpti</i>	-	-	46	5	6	14	-	11	-	-	3	-	-	-	
<i>Br. sp.</i>	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
<i>Ev. lenti</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ev. teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Pa. aragaoi</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pa. campograndensis</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pi. christenseni</i>	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	4
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	1	-	3	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	6
Subtotal	-	-	67	5	12	15	-	11	-	-	4	-	1	-	2	117
Total	-	-	68	34	17	40	4	12	-	-	5	29	19	4	70	302

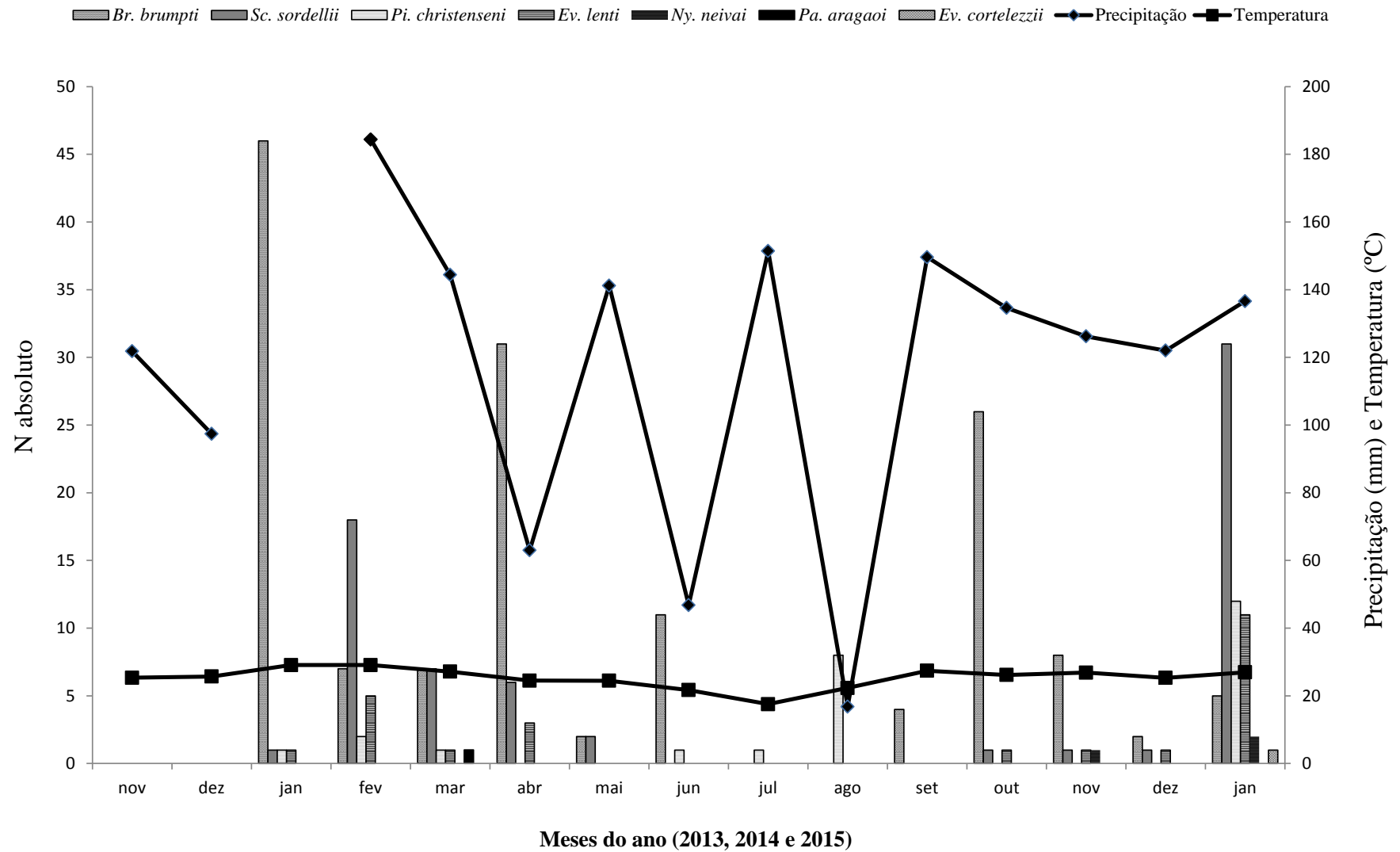


Figura 4. Acumulado mensal da precipitação pluviométrica (mm), temperatura (°C) e distribuição mensal dos números totais das espécies *Br. brumpti*, *Sc. sordellii*, *Pi. christenseni*, *Ev. lenti*, *Ny. neivai*, *Pa. aragaii* e *Ev. cortelezii*, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015.

Tabela 2. Número absoluto, índice de Shannon-Wiener, índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) e frequência de machos e fêmeas de flebotomíneos em fragmentos de mata e peridomicílios, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015; Nova Andradina, Mato Grosso do Sul, Brasil.

ESPÉCIES	FRAGMENTOS DE MATAS																					GERAL																					
	Mata A						Mata B						Mata C																														
	Peri		Borda		Interior		Total	Peri		Borda		Interior		Total	Peri		Borda		Interior		Total																						
	1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12		13	14	15	16	17	18																							
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	TOTAL	%	IAEP	P																
<i>Br. brumpti</i>	-	-	1	4	26	12	3	7	5	4	62	-	-	-	-	-	1	-	1	2	2	1	3	3	6	-	6	3	8	9	25	19	85	85	64	149	49,34	0,96	1 ^a				
<i>Br. sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	17	-	17	17	5,63	0,29	6 ^a						
<i>Ev. cortelezzii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,33	0,23	7 ^a					
<i>Ev. lenti</i>	-	-	2	2	-	4	2	9	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	6	18	24	7,95	0,33	4 ^a					
<i>Ev. teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	2	2	0,66	0,31	5 ^a					
<i>Ev. termitophila</i>	-	-	-	1	-	2	1	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	5	1,66	0,17	10 ^a					
<i>Ny. neivai</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	0,99	0,10	11 ^a					
<i>Pa. aragai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	1	0,33	0,08	12 ^a					
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	2	0,66	0,13	9 ^a						
<i>Pa. campograndensis</i>	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	4	1,32	0,19	8 ^a						
<i>Pi. christenseni</i>	-	-	-	3	-	4	-	6	-	5	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	1	4	-	26	26	8,61	0,42	3 ^a						
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	2	17	-	6	2	18	-	6	51	-	-	-	-	1	4	-	2	-	3	-	1	11	-	-	-	-	1	-	1	2	-	1	6	6	62	68	22,52	0,88	2 ^a
Subtotal	0	9	36	59	47	19						0	0	5	2	6	2				3	6	8	12	23	65							101	201	302	100,00							
Total	170						15						117						302																								
Total Geral	302																																										
Shannon-Wiener (H')	1,54						0,86						0,98																														

♂ = machos ♀ = fêmeas % = Frequência relativa IAEP = índice de abundância das espécies padronizado P = posição da espécie no ambiente.

Três exemplares de *Ny. neivai* foram coletados em peridomicílio e borda da mata A (Tabela 2) e, embora em baixa frequência neste estudo e em estudo anterior (ALMEIDA et al. 2013), ressalta-se que é incriminada como a principal vetora do agente etiológico da LT no Estado de São Paulo e em países americanos do Cone Sul, e é suspeita de transmitir *L. (V.) braziliensis* (CUTOLO et al. 2009, CARVALHO et al. 2010). Em Porto Alegre-RS apresentou a mais alta frequência com número superior de machos, e ficou evidenciada sua importância na transmissão de LT pelo diagnóstico positivo para *L. (V.) braziliensis* (ECKERT e SOUZA 2010). Em estudo realizado em áreas rurais nos estados do Paraná e São Paulo sobre preferência alimentar, os autores sugerem que a espécie ajusta seu hábito alimentar à disponibilidade de hospedeiros (DIAS-SVERSUTTI et al. 2007, MARASSÁ et al. 2013). Tem antropofilia comprovada e adaptação às alterações ambientais (CASANOVA et al. 2005, ANDRADE-FILHO et al. 2007, SOUZA et al. 2008, GALATI et al. 2010, MARASSÁ et al. 2013).

A espécie *Br. brumpti* destacou-se por estar presente em 12 dos 18 pontos de coletas e por ser a espécie com maior abundância de 49,34% (149) (Tabela 2). As espécies do gênero *Brumptomyia* estão associadas a tocas de tatu e ao comportamento selvático já observado por outros autores (FORATINI 1973, MAGABEIRA 1942, FRAIHA et al. 1970, AGUIAR e MEDEIROS 2003). A baixa frequência (02) na mata B também foi encontrada (03) por ALMEIDA et al. (2013), que sugerem que este baixo valor esteja ligado ao impacto da antropização, como deslocamento de humanos, erosão resultada do alto volume de água pluvial vindo das áreas superiores, descarte de resíduos sólidos na borda e deslocamento para interior da mata (Figura 5).

Sc. sordellii destacou-se neste estudo e em outros pela alta abundância em relação às demais espécies. Nesta pesquisa foi a segunda mais frequente (Tabela 2) tanto como ocorrido em uma gruta de Corumbá-MS (GALATI et al. 1997). Foi a quarta em abundância entre 23 espécies em São Luís-MA (MARINHO et al. 2008), e a quinta em Paço do Lumiar-MA (BARROS et al. 2000), em Cáceres-MT (ALVES et al. 2012), e em caverna de Lassance-MG, onde foi encontrada naturalmente infectada por flagelados (CARVALHO et al. 2012).



Figura 5. Características dos fragmentos de mata: Mata A (A1 e A2), Mata B (B1, B2, B3 e B4) e da Mata C (C1 e C2).

Várias espécies de flebotomíneos coletados neste estudo já foram encontradas infectadas por *Leishmania* em outros estados brasileiros:

Ev. cortelezzii apresentou-se infectada naturalmente por *L. (L.) chagasi* em Santa Luzia-MG (CARVALHO et al. 2008) e por *L. (V.) braziliensis* em Belo Horizonte-MG (SARAIVA et al. 2010); por *Leishmania* spp. em aldeia indígena de Dourados-MS (SANTOS 2010) e por *L. chagasi* em área urbana de Ponta Porã-MS (ANDRADE et al. 2011).

Ev. lenti foi encontrada naturalmente infectada com *Leishmania* sp. em Jacobina-BA (SHERLOCK et al. 1996), por *L. (V.) braziliensis* em Divinópolis-MG (MARGONARI et al. 2010) e por *L. (L.) chagasi* em Campo Grande-MS (PAIVA et al. 2010).

Ev. termithophila foi encontrada infectada por *L. (L.) infantum* em Belo Horizonte-MG (SARAIVA et al. 2010).

Pi. christenseni foi encontrada em ambiente de mata infectada naturalmente por *Leishmania* spp. em aldeia indígena de Dourados-MS (SANTOS 2010), e no Parque do Gafanhoto em Divinópolis-MG (MARGONARI et al 2010).

Pa. aragaoi foi encontrada infectada naturalmente por *L. (V.) braziliensis* em Campo Grande-MS (OLIVEIRA et al. 2003, PAIVA et al. 2010) e em Guaraí-TO (VILELA et al. 2013); por *Leishmania* spp. em aldeia indígena de Dourados-MS (SANTOS 2010) e no Parque do Gafanhoto em Divinópolis-MG (MARGONARI et al 2010).

Portanto, novos estudos devem buscar elucidar o papel destas espécies e sua relação com as leishmanioses.

6.2 Infecção Natural

6.2.1 Exame Parasitológico

O exame parasitológico foi realizado em 106 fêmeas e não foi observado formas flageladas. Constatou-se a presença de nematóides em uma fêmea de *Sc. sordellii* coletada no interior da mata A, e em uma fêmea de *Ev. teratodes* coletada no interior da mata B (Figura 6).



Figura 6. Imagens de nematóides presentes em flebotomíneos fêmeas quando dissecadas.

6.2.2 Análise molecular - PCR-RFLP

Das 106 fêmeas dissecadas foram montados 55 *pools* (amostras), das espécies *Br. sp.*, *Br. brumpti*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. lenti*, *Ev. teratodes*, *Ev. termitophila*, *Ny. neivai*, *Pa. aragaoi*, *Pa. bigeniculata*, *Pa. campograndensis*, *Pi. christenseni* e *Sc. sordellii*.

Apresentaram-se positivas para o gênero *Leishmania* na PCR seis amostras de quatro espécies de flebotomíneos: *Pi. christenseni*, *Ev. lenti*, *Sc. sordellii* e *Ev. teratodes* (Tabela 3).

Tabela 3. Número absoluto de fêmeas de cada espécie positiva para o gênero *Leishmania*, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015.

Amostras	nº de fêmeas	Espécies	Mata	Ecótopo	Época da coleta
14	1	<i>Pi. christenseni</i>	Miguel	borda	junho-2014
27	2	<i>Pi. christenseni</i>	Miguel	borda	novembro-2014
29	1	<i>Ev. lenti</i>	Miguel	interior	janeiro-2015
40	5	<i>Sc. sordellii</i>	Miguel	interior	janeiro-2015
41	1	<i>Sc. sordellii</i>	Miguel	interior	janeiro-2015
52	1	<i>Ev. teratodes</i>	Municipal	interior	janeiro-2015
Total	11				

Foram observadas três fêmeas positivas para *Leishmania*, todas para a espécie *Pi. christenseni* e em borda de mata. Mais oito fêmeas foram positivas, sendo que a espécie *Sc. sordellii* foi predominante e todas em interior de mata.

A taxa mínima de infecção por *Leishmania* para o total de fêmeas foi 5,66 % e está representada na tabela 4.

Tabela 4. Número de fêmeas de flebotomíneos submetidas à análise molecular para investigação da presença de DNA de *Leishmania* e frequência de positividade segundo a espécie de *Leishmania*.

Espécies de flebotomíneos	Nº de fêmeas submetidas à PCR (Nº de pools)	Nº de pools positivos	<i>Leishmania</i> spp. (Nº de fêmeas positivas)	% de fêmeas positivas
<i>Br. brumpti</i>	30 (16)	-	-	-
<i>Ev. cortelezzii</i>	1 (1)	-	-	-
<i>Ev. lenti</i>	12 (6)	1	<i>L. amazonensis</i> (1)	0,94
<i>Ev. teratodes</i>	2 (2)	1	<i>L. amazonensis</i> (1)	0,94
<i>Ev. termitophila</i>	3 (2)	-	-	-
<i>Ny. neivai</i>	2 (2)	-	-	-
<i>Pa. aragaoi</i>	-	-	-	-
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	-	-
<i>Pa. campograndensis</i>	1 (1)	-	-	-
<i>Pi. christenseni</i>	24 (11)	2	<i>Leishmania</i> spp. (3)	1,89
<i>Sc. sordellii</i>	31 (14)	2	<i>L. amazonensis</i> (5) <i>Leishmania</i> spp. (1)	1,89
Total	106 (55)	6	11	5,66

As seis amostras amplificadas na PCR foram submetidas à RFLP que determinou a infecção por *L. (L.) amazonensis* nas espécies *Ev. lenti* (amostra 29), *Sc. sordellii* (amostra 40) e *Ev. teratodes* (amostra 52) (Figura 7). Até o momento não havia registro de infecção por *L. (L.) amazonensis* nestas espécies.

Para as três amostras: 14 e 27 (*Pi. christenseni*) e 41 (*Sc. sordellii*) não se pode afirmar que amplificaram para *L. (L.) amazonensis*. Na impossibilidade de confirmação do agente etiológico, serão consideradas infectadas naturalmente por *Leishmania* spp.

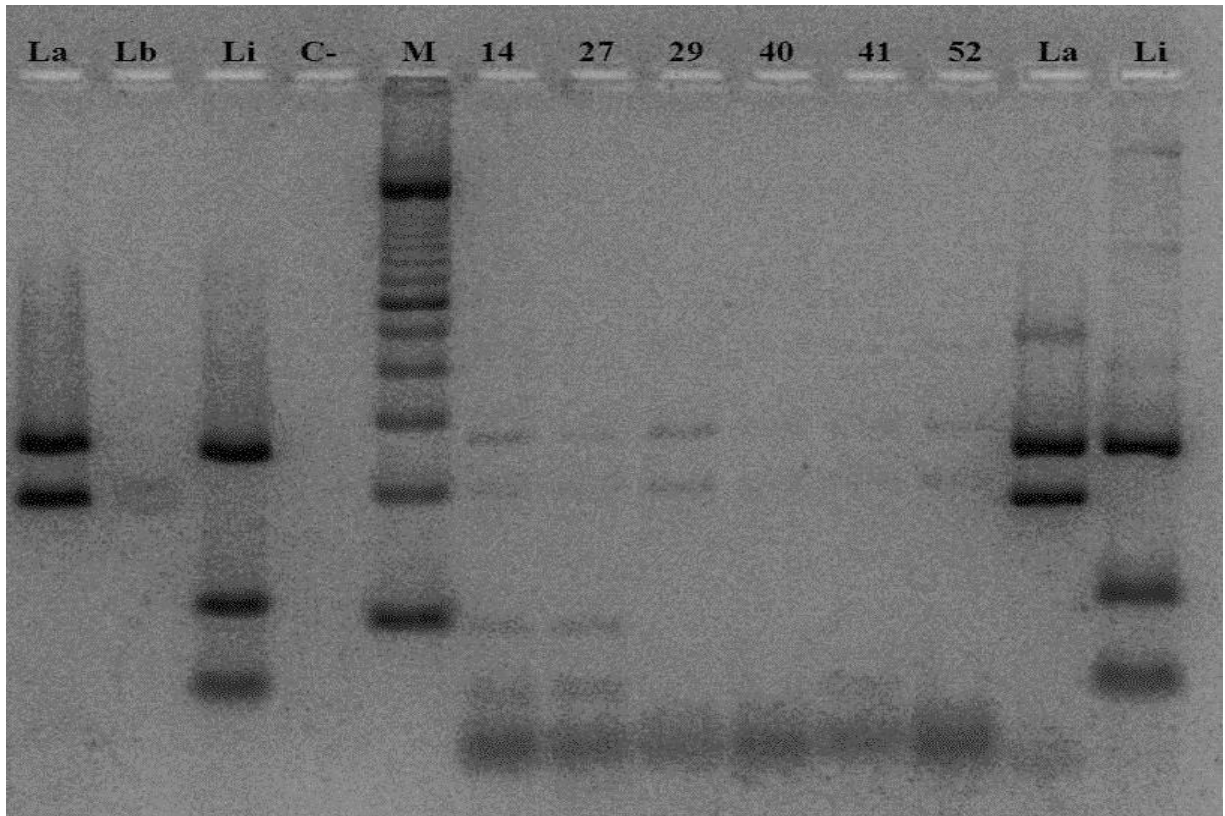


Figura 7. Produtos amplificados pela técnica de PCR seguida de Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ITS 1 (RFLP) com a enzima *Hae* III. Colunas: controles positivos: La = *L. (L.) amazonensis*; Lb = *L. (V.) braziliensis*; Li = *L. (L.) infantum*. C- = controle negativo. M = marcador molecular de 100 pb. Amostras: 14 e 27 = *Pi. christenseni* (positivas para *Leishmania* spp.; 29 = *Ev. lenti* e 40 = *Sc. sordellii* (positiva para *L. (L.) amazonensis*); 41 = *Sc. sordellii* (positiva para *Leishmania* spp.) e 52 = *Ev. teratodes* (positiva para *L. (L.) amazonensis*).

Leishmania amazonensis tem sido associada a uma variedade de formas clínicas da LT (BARRAL et al. 1991), inclusive com a leishmaniose cutânea difusa, de difícil cura com qualquer forma de quimioterapia (LAINSON 1997, MARZOCHI e MARZOCHI 1994) e tem *Bichromomyia flaviscutellata* como principal vetor (LAINSON e SHAW 2005). Em Mato Grosso do Sul, a infecção por este parasita apresenta-se dispersa e é encontrada em humanos, felinos domésticos e em flebotomíneos. No município de Campo Grande, foi encontrada em felino doméstico (SOUZA et al. 2005), em Bela Vista, em humanos (DORVAL et al. 2006) e em hamsters que permaneceram como isca em armadilhas de Disney (DORVAL et al. 2010), no município de Ribas do Rio Pardo, em felino doméstico (SOUZA et al. 2009) e em Bonito, no flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (PAIVA et al. 2006, SAVANI et al. 2009). Portanto, o presente relato de infecção natural por *L. (L.) amazonensis* nas três espécies de flebotomíneos (*Ev. lenti*, *Sc. sordellii* e *Ev. teratodes*), até então sem registros da infecção,

suscita a necessidade de investigações sobre o significado destes achados na cadeia de transmissão deste parasita nas áreas estudadas do município de Nova Andradina-MS, uma vez que há a presença de animais mamíferos, como gambás, macacos-prego, veados, onças, porcos-espinho e tatus na mata Miguel (A); quatis, macacos-prego e tatus na mata Municipal (B) que podem ser hospedeiros de *Leishmania* sp.

7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínea nas três áreas de fragmentos de mata e dos peridomicílios adjacentes constituiu-se de 11 espécies: *Br. brumpti*, *Ev. cortellezii*, *Ev. lenti*, *Ev. teratodes*, *Ev. termitophila*, *Ny. neivai*, *Pa. aragaoi*, *Pa. bigeniculata*, *Pa. campograndensis*, *Pi. christenseni* e *Sc. sordellii*. Agrupadas em seis gêneros, em três subtribos: Brumptomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina.

É registrado pela primeira vez a presença de *Ev. cortellezii*, *Pi. christenseni*, *Pa. aragaoi* e *Pa. bigeniculata* em Nova Andradina-MS; ampliando o conhecimento da diversidade da fauna de flebotomíneos do município, que acrescida de informações de estudo prévio, é constituída por 16 espécies, cinco anteriormente assinaladas: *Br. avellari*, *Br. pintoii*, *Ev. carmelinoi*, *Pi. pessoai* e *Pa. punctigeniculata*, mais as 11 espécies obtidas no presente estudo.

A maior diversidade e abundância das espécies foram observadas na borda e interior das matas, áreas com menor ação humana. Portanto, a conservação destes fragmentos é importante para abrigar animais silvestres, a fauna de flebotomíneos e assim evitar que os mesmos se desloquem para áreas residenciais.

Apesar da baixíssima frequência de *Ny. neivai* no presente estudo e em estudo anterior, a capacidade adaptativa deste importante vetor de LT em áreas no Sul e Sudeste do Brasil e em dois países do Cone Sul (Paraguai e Argentina) e em ambiente antrópico, bem como a presença de outra espécie vetora suspeita, *Pi. pessoai* (estudo anterior), em Nova Andradina-MS; devem servir de alerta para os órgãos competentes de saúde pública e meio ambiente, quanto à possibilidade de transmissão da doença. Medidas de preservação dos fragmentos de matas que servem de abrigos para os hospedeiros e vetores da LT, podem evitar a dispersão e adaptação destes às áreas residenciais. No entanto, adverte-se que *Ny. neivai*, embora ainda dependente de ambiente de matas, pode ter a sua abundância muito aumentada em peridomicílios com a presença de animais domésticos e situados próximos a fragmentos de matas, conforme relatos de vários estudos. Portanto, nestas circunstâncias, as chances de transmissão de *Leishmania* para a população humana pode em muito ser ampliada.

E tendo em vista a ocorrência de espécies vetoras de agentes da LT, aconselha-se a continuidade de vigilância entomológica e estudos de infecção natural de flebotomíneos em fragmentos de matas e áreas vizinhas com vistas a acompanhar o comportamento de vetores e de seus agentes etiológicos.

Registra-se, pela primeira vez a presença de DNA de *L. (L.) amazonensis* em *Ev. lenti*, *Ev. teratodes* e *Sc. sordellii* e de *Leishmania* spp. em *Pi. christenseni* e *Sc. sordellii*, denotando a importância de continuidade de investigações para verificar se estas espécies podem desempenhar papel de vetor de agente etiológico da leishmaniose tegumentar.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR GM, MEDEIROS WM. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz 207-255p.
- ALMEIDA PS, NASCIMENTO JC, FERREIRA AD, MINZÃO LD, PORTES F, MIRANDA AM, FACCENDA O, ANDRADE-FILHO JD. 2010. Espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em ambiente urbano em municípios com transmissão de leishmaniose visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 54(2): 304-310p.
- ALMEIDA OS, LEITE JA, ARAÚJO AD, BATISTA PM, TOURO RBS, ARAÚJO VS, SOUZA EJ, RODRIGUES JB, OLIVEIRA GA, SANTOS JV, FACCENDA O, ANDRADE-FILHO JD. 2013. Fauna of Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in areas with endemic American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 57(1): 105-112p.
- ALVES GB, OSHIRO ET, LEITE MC, MELÃO AV, RIBEIRO LM, MATEUS NLF, BRAZIL RP, ANDRADE-FILHO JD, OLIVEIRA AG. 2012. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, state of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(4): 437-443p.
- ANDRADE ARO, DORVAL MEMC, ANDRADE SMO, MARQUES A, LIMA JUNIOR MSC, SILVA BAK, ANDREOTTI R. 2011. First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania (Leishmania) chagasi* captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 253-258p.
- ANDRADE-FILHO JD, GALATI EAB e FALCÃO AL. 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological significance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 481-487p.
- ANDRADE-FILHO, JD, OLIVEIRA RC, FONSECA AR. 2008. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malase no Centro-Oeste de Minas Gerais. *Neotropical Entomology* 37(1): 104-106p.
- ANDRADE-FILHO, JD, BRAZIL RP. 2009. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas State, Northeast of Brazil. *Neotropical Entomology* 38(5): 688-690p.
- APARÍCIO C. 2001. Utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto orbital para análise espacial de paisagem com incidência de leishmaniose tegumentar americana. [Dissertação de mestrado em Ecologia de Ecossistemas Terrestres e Aquáticos - Instituto de Biociências da USP, São Paulo-SP].
- AZEVEDO PCB, LOPES GN, FONTELES RS, VASCONCELOS GC, MORAES JLP, REBÊLO JMM. 2011. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. Londrina: *Neotropical Entomology* 40(2): 271-277p.

- BARATA RA, FRANÇA-SILVA JC, FORTES-DIAS CL, COSTA RT, SILVA JC, VIEIRA EP, PRATA A, MICHALSKY EM, DIAS ES. 2004. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, na endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 481-487p.
- BARRAL A, PEDRAL SAMPAIO D, GRIMALDI Jr G, MOMEN H, MCMAHON-PRATT D, JESUS AR, ALMEIDA R, BADARÓ R, BARRA NETO M, CARVALHO EM, JONHSON WD. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* is produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-546p.
- BARROS VLL, REBÊLO JMM, SILVA FS. 2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do Município de Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. *Caderno de Saúde Pública* 16(1): 265-270p.
- BARBOSA GM, MARZOCHI MCA, MASSARD CL, LIMA GPS, CONFORT EM. 1999. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 15: 641-646p.
- BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde. 120p.
- BRASIL. 2007. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar americana. 2 edição. Brasília: Ministério da Saúde. 180p.
- BRASIL. 2009. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica: Vigilância em Saúde – Zoonoses. Brasília: Ministério da Saúde. 124p.
- BRAZIL RP, BRAZIL BG. 2003. Biologia de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz cap. 4, 257-274p.
- CARVALHO GM, ANDRADE-FILHO JD, FALCAO AL, ROCHA LIMA AC, GONTIJO CM. 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8(3): 407-414p.
- CARVALHO GML, BRAZIL RP, SARAIVA L, QUARESMA PF, BOTELHO HA, RAMOS MCNF, ZENÓBIO APLA, MEIRA PCLS, SANGUINETTE CC, ANDRADE-FILHO JD. 2012. Hourly Activity and Natural Infection of Sandflies (Diptera: Psychodidae) Captured from the Aphotic Zone of a Cave, Minas Gerais State, Brazil. *Plos One* 7(12).
- CARVALHO MSL, BREDT A, MENEGHIN ERS, OLIVEIRA C. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008 Brasília: *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 19(3).
- CASANOVA C, COSTA AIP e NATAL D. 2005. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southstern Brazil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* 100(7): 719-724p.
- CASARIL AE, MONACO NZN, OLIVEIRA EF, EGUCHI GU, PARANHOS FILHO AC, PEREIRA LE, OSHIRO ET, GALATI EAB, MATEUS NLF, OLIVEIRA AG. 2014.

Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. *Parasites & Vectors* 7: 364-12p.

CELLA W, MELO SCCS, LEGRIFON CMO, FREITAS JS, KUHLE JB, TEODORO U, ROSSI RM. 2011. Flebotomíneos de localidades rurais no noroeste do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 27(12): 2461-2468p.

CHANIOTIS BN. 1974. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology*, 11(1): 73-79p.

CIRMERMAN B, CIMERMAN S. 1999. *Parasitologia e seus fundamentos Gerais*. Editora Atheneu, 39-80p.

CORTE AA, NOZAWA MR, FERREIRA MC, PIGNATTI MG, RANGEL O, LACERRA SS. 1996. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. *Caderno de Saúde Pública* 12(4): 465-472p.

COSTA AP. 2001. Estudo de fatores ambientais associados à transmissão da leishmaniose tegumentar americana através do sensoriamento remoto orbital e sistema de informação geográfica [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.

CUTOLO AA, TRONCARELLI MZ, MACHADO JG, LUVIZOTTO MCR, VON ZUBEN CJ, LANGONI H, GIORGIO S. 2009. Vigilância epidemiológica das leishmanioses no município de Monte Mor, estado de São Paulo, Brasil. *Veterinária e Zootecnia* 16(4): 634-641p.

DEDET JP. 1993. *Leishmania* et leishmaniasis du continent américain. Ann L' Instituto Pasteur, 4(1): 3-25p.

DESJEUX P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infections Diseases* 27: 305-318p.

DIAS-SVERSUTTI AC, SCODRO RBL, REINHOLD-CASTRO KR, NEITZKE HC, TEODORO U. 2007. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. *Neotropical Entomology* 36(6): 953-959p.

DORVAL MEC, OSHIRO ET, CUPOLLILO E , CASTRO ACC3, ALVES TP. 2006. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(1): 43-46.

DORVAL MEC, ALVES TP, CRISTALDO G, ROCHA HC, ALVES MA, OSHIRO ET, OLIVEIRA AG, BRAZIL RP, GALATI EAB, CUNHA RV. 2010. 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* 43(5): 491-495.

- DOURADO MIC, NORONHA CV, ALCANTARA N, ICHIHARA MY, LOUREIRO S. 1989. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública* 23(1): 2-8p.
- ECKERT J, SOUZA GD. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho & Barretto) no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: *Revista brasileira de Biociências* 8(4): 399-402p.
- EL TAI NO, OSMAR OF, EL FARI M, PRESBER WH, SCHÖNIAN G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 94(5): 575-579p.
- FEITOSA MAC, CASTELLÓN EG. 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazônica* 34: 121-127p.
- FERREIRA RC, DE SOUZA AA, CAMPANER M, TAKATA CS, SHAW JJ, TEIXEIRA MM. 2008. A phylogenetic lineage of closely related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55(5): 427-435p.
- FIOCRUZ. 2013. Leishmaniose. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acessado em: 12/2014.
- FORATTINI, OP. 1973. *Entomologia médica*. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp, v.4, 658p.
- FRAIHA H, SHAW JJ, LAINSON R. 1970. Phlebotominae brasileiros 1: Descrição de uma nova espécie de *Brumptomyia* e chave para identificação dos machos das espécies do gênero (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 465-470p.
- GALATI EAB, NUNES VLB, DORVAL MEMC, OSHIRO ET, CRISTALDO G, ESPÍNDOLA MA, ROCHA HC, GARCIA WB. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 30(2): 115-128p.
- GALATI EAB, NUNES VLB, REGO-JR FA, OSHIRO ET, CHANG MR. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 31(4): 378-390p.
- GALATI EAB. 2003. Morfologia e taxonomia. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz 23-51p.
- GALATI EAB, NUNES VLB, CRISTALDO G, ROCHA HC. 2003a. 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 de Patologia Tropical* 32(2): 235-261p.

GALATI EAB, NUNES VLB, BOGGIANI PC, DORVAL MEMC, CRISTALDO G, ROCHA HC, OSHIRO ET, GONÇALVES-DE-ANDRADE RM, NAUFEL G. 2003b. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 47(2): 283-296p.

GALATI EAB, NUNES VLB, BOGGIANI PC, DORVAL MEMC, CRISTALDO G, ROCHA HC, OSHIRO ET, DAMASCENO-JUNIOR GA. 2006. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested áreas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(2): 175-193p.

GALATI EAB, FONSECA, MB, MARASSÁ AM, BUENO EMF. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 1148-1158p.

GALATI EAB, MARASSÁ AM, FONSECA MB, GONÇALVES-ANDRADE RM, CONSALES CA, BUENO EFM. 2010. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district – area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 54(4): 665-676p.

GALATI EAB. 2014. *Classificação de Phlebotominae*. Apostila da disciplina HEP 5752 do Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública. São Paulo, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública/USP. <www.fsp.usp.br/~egalati>.

GAMA NETO JL, FREITAS RA, BAIMA JM, PASSOS MAB. 2010. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(2): 155-168p.

GOMES AC, BARATA JMS, ROCHA e SILVA EO, GALATI EAB. 1989. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil (1). *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 31(1): 32-39p.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1): 71-80p.

GONTIJO CMF, MELO MN. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7(3): 338-349p.

GRAMICCIA M, GRADONI L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35: 1169-1180p.

GREVELINK SA, LERNER E. 1996. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 34: (2): 257-272p.

IBGE. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acessado em: fevereiro/2011.

INCT-EM. 2012. Capítulo 12. A interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0CCcQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.inctem.bioqmed.ufrj.br%2Fbiblioteca%2Ffarthrolivro-1%2Fcapitulo-12-a-interacao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores%2Fat_download%2Ffile&ei=tWAVLH_N8yagwTzl4K4Ag&usg=AFQjCNHR0EIWXzAyoFejnwzL6DyacGWG5w&sig2=1Uu9qIORYfU8LZW1GBZy4A&bvm=bv.80642063,d.eXY>. Acessado em: 12/2014.

JOHNSON PT, MCCONNELL E, HERTIG M. 1963. Natural infections of Leptomonad flagelates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *Experimental Parasitology* 14(1): 107-122p.

KILLICK-KENDRICK R, WARD DH. 1981. Transmission of leishmaniosis by the bait of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 75: 152-154p.

KILLICK-KENDRICK R. 1990. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology* 4: 1-24p.

LAINSON R. 1997. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 11(1): 29-40p.

LAINSON R, SHAW JJ. 2005. New World leishmaniasis. In: Cox FEG, Lreier JP, Wakelin D (eds.) Topley & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections. London/ Sydney: *Auck-land Parasitology* 313-49p.

MALAFAIA G, RODRIGUES ASL, TALVANI A. 2010. Ética na publicação de pesquisas sobre leishmaniose visceral humana em periódicos nacionais. *Revista de Saúde Pública* 45(1): 166-172p.

MAMGABEIRA O. 1942. 8ª Contribuição estudo dos Flebotomus (Diptera: Psychodidae). *Flebotomus (Brumptomyia) avellari* Costa lima, 1932. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 37(3): 225-240p.

MARASSÁ AM, GALATI EAB, BERGAMASCHI DP, CONSALES AC. 2013. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46: 547-554p.

MARCONDES CB. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomological News* 118(4): 351-356p.

MARCONDES AB. 2011. *Entomologia Médica e Veterinária*. Capítulo 5 Flebotomíneos. 2 Edição. São Paulo: Editora Atheneu. 526p.

MARGONARI C, SOARES RP, ANDRADE-FILHO JD, XAVIER DC, SARAIVA L, FONSECA AL, SILVA RA, OLIVEIRA ME, BORGES EC, SANGUINETTE CC e MELO MN. 2010. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in

Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. Washington: *Journal of Medical Entomology* 47: 1212-1219p.

MARINHO RM, FONTELES RS, VASCONCELOS GC, AZEVEDO PCB, MORAES JLP, REBÊLO JMM. 2008. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52(1): 112-116p.

MARTINS F, SILVA IG, BEZERRA WA, MACIEL JM, SILVA HHG, LIMA CG, CANTUÁRIA PB, RAMOS OS, RIBEIRO JB, SANTOS AS. 2002. Diversidade e frequência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. *Revista de Patologia Tropical* 31(2): 211-224p.

MARZOCHI, MCA. 1989. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: *Grandes Endemias Brasileiras*. Editora Universidade de Brasília, DF.

MARZOCHI MC. 1992. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Journal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104p.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública* 10(2): 359-375p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acessado em: 27/03/2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2014a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>>. Acessado em: 27/03./ 014.

MIRANDA C, MASSA JL, MARQUES CCA. 1996. Análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 30(5): 433-437p.

MISSAWA NA, LOROSA ES, DIAS ES. 2008. 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* 41(4): 365-368p.

MORRISON AC, FERRO C, MORALES A, TESH R. e WILSON ML. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal Medical Entomology* 30: 427-435p.

NASCIMENTO JC, PAIVA BR, MALAFRONTA RS, FERNANDES WD, GALATI EAB. 2007. Natural infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 49(2): 119-122p.

NATAL D, MARUCCI D, REIS IM, GALATI EAB. 1991. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). *Revista Brasileira de Entomologia* 35(4): 697-700p.

NUNES VLB, DORVAL MEMC, OSHIRO ET, NOGUCHI RC, ARÃO LB, HANS FILHO G, ESPÍNDOLA MA, CRISTALDO G, ROCHA HC, SERAFINI LN, SANTOS D. 1995. Estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – Estudos na população humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28(3):185-193.

OLIVEIRA AG, ANDRADE-FILHO JD, FALCÃO AL, BRAZIL RP. 2001. A new sand fly, *Lutzomyia campograndensis* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(3): 325-329p.

OLIVEIRA AG, ANDRADE-FILHO JD, FALCÃO AL, BRAZIL RP (2003) Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Caderno de Saúde Pública* 19(4): 933-944p.

OLIVEIRA AG, GALATI EAB, OLIVEIRA O, OLIVEIRA GR, ESPINDOLA IAC, DORVAL MEC, BRASIL RP. 2006. Abundância de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e urbano de transmissão da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rio de Janeiro: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(8): 869-874p.

OLIVEIRA GMG, FIGUEIRÓ FILHO EA, ANDRADE GMC, ARAÚJO LA, OLIVEIRA MLG, CUNHA RV. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Ananindeua: *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(3): 83-94p.

OLIVEIRA DM, REINHOLD-CASTRO KR, BERNAL MVZ, LEGRIFON CMO, LONARDONI MVC, TEODORO U, SILVEIRA TGV. 2011. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector-Borne Zoonotic Disease* 11: 137-143p.

OLIVEIRA-PEREIRA YN, RÊBELO JMM, MORAES JLP, PEREIRA SRF. 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia Maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(6): 540-543p.

PAIVA BR, PASSOS LN, FALQUETO A, MALAFRONTA RS, ANDRADE JR HF. 2004. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 469(6): 335-338p.

PAIVA BR, SECUNDINO NFC, NASCIMENTO JC, PIMENTA PFP, GALATI EAB, ANDRADE JR HF, MALAFRONTA RS. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies base don mini-exon gene PCR. *Acta Tropica* 99(2-3): 252-259p.

- PAIVA BR, SECUNDINO NF, PIMENTA PF, GALATI EAB, MALAFRONTA RS. 2007. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Caderno de Saúde Pública* 23(1): 87-94p.
- PAIVA BR, OLIVEIRA AG, DORVAL MEMC, GALATI EAB, MALAFRONTA RS. 2010. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Tropica* 2(13): 1-5p.
- PEARSON RD, SOUSA AQ. 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1-13p.
- PELLISSARI DM, CECHINEL MP, SOUSA-GOMES ML, LIMA JUNIOR FEF. 2011. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 20(01): 107-110p.
- PENHA TA, SANTOS ACG, REBÊLO JMM, MORAES JLP, GUERRA RMSNC. 2013. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Luís-MA, Brasil. *Revista Biotemas* 26(2): 121-127p.
- PIMENTA PFP, SECUNDINO NFC, NIEVES BEE. 2003. Interação Vetor-Hospedeiro. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz 275-289p.
- QUEIROZ MFM, VARJAO JR, MORAES SC, SALCEDO GE. 2012. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(3): 313-317p.
- RANGEL EF, LAINSON R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7): 937-954p.
- READY PD. 1979. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 16(5): 413-423p.
- REBÊLO JMM. 2001. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 17(1): 221-227p.
- ROBERTS DR, HSI BP. 1979. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environmental Entomology* 8(6): 1007-1013p.
- REIS SR, LUIS GOMES HM, FERREIRA NM, NERY LR, PINHEIRO FG, FIGUEIRA LP, SOARES FV, FRANCO AMR. 2013. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. *Acta Amazonica* 43(1): 121-124p.
- SÁBIO PB, ANDRADE AJ, GALATI EAB. 2014. Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology* 51: 331-341p.

SHANNON CE. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Techn. J.* 27: 379-423p.

SANTOS KM. 2010. Levantamento da fauna e índice de infecção natural por flagelados em Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) na aldeia indígena Jaguapiru na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Dourados. [Dissertação de mestrado]. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) 85p.

SANTOS TV, BARATA IR, SOUZA AAA, SILVEIRA FT, LAINSON R. 2011. Primeiro registro de *Lutzomyia termitophila* Martins, Falcão e Silva (1964) e *Lutzomyia hermanlenti* Martins, Silva e Falcão (1970) (Diptera: Psychodidae) no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2(4): 47-50p.

SARAIVA L, LOPES JS, OLIVEIRA GBM, BATISTA FA, FALCÃO AL, ANDRADE-FILHO JD. 2006. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(1): 56-63p.

SARAIVA L, ANDRADE-FILHO JD, SILVA SO, ANDRADE ASR, MELO MN. 2010. 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* 105(8): 1033-1039p.

SAVANI ES, NUNES VLB, GALATI EAB, CASTILHO TM, ZAMPIERI RA, FLOETER-WINTER LM. 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Veterinary Parasitology* 160 (1-2): 18-20p.

SCHÖNIAN G, NASCREDDIN A, DINSE N, SHWYNOCH C, SCHALLIG HDFH, PRESBER W, JAFFE CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47(1): 349-358p.

SHAW JJ. 2002. *New World Leishmaniasis: The ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America*. In: Farrel (ed.) *World Class Parasites: Leishmania*. Boston: Kluwer Academic Publishe 11-31p.

SHERLOCK IA. 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 671-683p.

SHERLOCK IA. 2003. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz 15-22p.

SHIMABUKURO PHF, GALATI EAB. 2011. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropical* 11 (supll. 1): 685-704p.

SHIMABUKURO PHF, TOLEZANO JE, GALATI EAB. 2011. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 51(27): 399-441p.

SILVA DF, VASCONCELOS SD. 2005. Flebotomíneo em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. Uberaba: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(3): 264-266p.

SILVA FS, CARVALHO LPC, SOUZA JM. 2012. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área rural do nordeste do estado do Maranhão, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 41(3): 337-347p.

SINAN/SES. 2015. Secretaria de Estado de Saúde, Vigilância Epidemiológica, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), Mato Grosso do Sul.

SINAN/SMS. 2015. Secretaria Municipal de Saúde, Vigilância Epidemiológica, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), Nova Andradina-MS.

SOUZA AI, BARROS SEM, ISHIKAWA EAE, ILHA IMN, MARIN GRB, NUNES VLB. 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 128(2): 41-45p.

SOUZA GD, GONÇALVES BRD, FLORES C, RANGEL S, SANTOS E, VILELA M, AZEVEDO A, e RANGEL EF. 2008. Monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre, RS. *Boletim Epidemiológico* ano X, 39: 5-6p.

SOUZA AI, NUNES VLB, BORRALHO VM, ISHIKAWA EAY. 2009. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul, State, Brazil: A case report. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 15(2): 360p.

TOLEZANO JE, TANIGUCHI HH, ELIAS CR, e LAROSA R. 2001. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 60(1): 47-51p.

VILELA ML, PITA-PEREIRA D, AZEVEDO CG, GODOY RE, BRITTO C, RANGEL EF. 2013. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108(5): 578-585p.

WHO. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acessado em: 12/2014.

WHO. 2014a. Disponível em: <http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png?ua=1>. Acessado em: 12/2014.

WHO. 2014b. Disponível em: <http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png?ua=1>. Acessado em: 12/2014.