

BYANCA REGINA DE PAIVA

**"Utilização da PCR na identificação de espécies de
leishmânias e do hábito alimentar em flebotomíneos
(Díptera: Psychodidae) de regiões do Mato Grosso do Sul,
Brasil"**

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Parasitologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

BYANCA REGINA DE PAIVA

**"Utilização da PCR na identificação de espécies de
leishmânias e do hábito alimentar em flebotomíneos
(Díptera: Psychodidae) de regiões do Mato Grosso do Sul,
Brasil"**

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Parasitologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

ORIENTADOR: Prof. Dr. Heitor Franco Andrade Jr

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Byanca Regina de Paiva.

Título da Tese: "UTILIZAÇÃO DA PCR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMÂNIAS E DO HÁBITO ALIMENTAR EM FLEBOTOMÍNEOS (DÍPTERA: PSYCHODIDAE) DE REGIÕES DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL".

Orientador: Heitor Franco de Andrade Jr.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Presidente Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Aos meus pais, Rosa e Aparecido, pelo incentivo e apoio
para minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e força,

A Profa. Rosely Malafronte por me receber em seu grupo e pelos bons frutos colhidos neste período,

A Profa. Eunice Galati pela colaboração nos experimentos com uso de flebotomíneos,

A Dra. Elisabeth Dorval e a Dra. Alessandra Oliveira da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pelos flebotomíneos e outras amostras biológicas coletadas em Mato Grosso do Sul,

Aos Pesquisadores Ângela Junqueira (FIOCRUZ), Ana Maria Duarte e Adriano Pinter dos Santos (SUCEN), Ana Marassá e a Equipe de Campo da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos (Instituto Adolfo Lutz), Dafne do Valle Dutra de Andrade Neves (DEPAVE) e Susana Pessoa de Lima (ICB) por fornecer amostras para este projeto,

Agradeço à Banca de Qualificação, Profa. Teresinha Shumaker, Profa. Margareth Capurro e Profa. Márcia Dalastra, pela discussão e sugestões que ajudaram a concluir este estudo,

À Comissão Julgadora da defesa desta tese pela finalização deste trabalho,

À Comissão de Pós-Graduação da Parasitologia do ICB e a Ângela de Jesus e Wilma Garcia, pelos esclarecimentos na resolução de todas as questões ligadas ao cumprimento deste Doutorado,

Ao Prof. Heitor Franco de Andrade Jr e o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por me receber e ceder espaço para o desenvolvimento deste projeto,

Ao LIMHCUSP 49 – Protozoologia, a CAPES e FAPESP, pelo financiamento,

Aos funcionários do laboratório de Protozoologia, em especial Luciano Monteiro e Sonia Pedrozo Gomes pela ajuda constante,

Aos meus colegas de laboratório, em especial minhas amigas, Adriana Yurika Maeda, Ana Maria Duarte, Izilda Curado, Luana Souza Dias, Tasciane Yamasaki, Amanda Neves e Isabel Cristina, pelo convívio e amizade,

Ao meu pai Aparecido, irmãos, Richard, Juliana, Isabela e as minhas pequenas Ila e Sofia, pelo carinho,

A Marcos Roberto pela amizade e cumplicidade

Agradeço à minha mãe Rosa, pelo imenso apoio em todos os momentos da minha vida,

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis, pessoas incomparáveis.”

FERNANDO PESSOA

RESUMO

PAIVA, B. R. **"Utilização da PCR na identificação de espécies de leishmânias e do hábito alimentar em flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) de regiões do Mato Grosso do Sul, Brasil"**. 144 f. (*Tese de Doutorado*) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As leishmanioses são protozooses de alta prevalência em regiões tropicais como o Brasil, transmitidas por vetores flebotomíneos, cujos reservatórios são compostos por diferentes espécies animais. No vetor, os parasitos assumem uma forma flagelada indistinguível entre as espécies e outros tripanossomatídeos. A doença apresenta amplo espectro pela existência de varias espécies de leishmânias e por diferenças na susceptibilidade individual dos hospedeiros. Tanto para o prognóstico individual como também nas investigações epidemiológicas, levando-se em conta futuras medidas de controle desta doença, a identificação espécie específica é de crucial importância. Um fator importante na rede causal é a determinação da preferência alimentar dos vetores, permitindo assim a intervenção adequada no controle da doença e de seus reservatórios. Atualmente, técnicas moleculares como a PCR, permitem diagnosticar a infecção, identificar a espécie infectante no vetor e seus hospedeiros, assim como o hábito alimentar dos flebotomíneos. Observou-se um aumento significativo de notificações de leishmaniose tegumentar e visceral no Estado do Mato Grosso do Sul, sendo que até o presente momento, pouco se conhece a respeito de sua etiologia. Neste sentido, em colaboração com pesquisadores do Mato Grosso do Sul e por meio da técnica de PCR, temos como objetivo: determinar a infecção natural dos flebotomíneos capturados em campo; identificar as espécies de

leishmânias provenientes de amostras humanas e caninas e isoladas em hamster; padronizar reação que determine a fonte alimentar de flebotomíneos; em Campo Grande e Bela Vista. Para a identificação de leishmânia, foi utilizada como alvo seqüências de mini – exon e nos casos positivos para subgênero *Viannia* utilizou-se a técnica de RFLP. Para identificação de fonte alimentar foi utilizado como alvo regiões conservadas do gene *citocromo b*. Na capital Campo Grande, a captura foi realizada no período de 2003 a 2005. Entre os anos de 2003 - 2004 a taxa mínima de infecção (TM) foi de 1,6%, sendo identificado *L.(V.) braziliensis*, já para o período de 2004 - 2005 a TM foi de 0,38%, para *L.(L.) amazonensis*, cuja maioria das espécies pertencia à *Lu. longipalpis*. Cinco amostras humanas provenientes de Campo Grande e outros municípios e isolados em hamster foram identificadas como *L.(V.) braziliensis*. No município de Bela Vista, no período entre 2004-2006, a maioria das espécies capturadas pertencia à espécie *Bi. flaviscutelata*. Destes, foi possível identificar TM de 0,6% de *L. (L.) amazonensis* e taxa de 0,24% para outros tripanossomatídeos. De um total de 10 amostras de cães isoladas em hamsters, 2 foram identificadas como *L.(L.) amazonensis*. A PCR para identificação de fonte alimentar foi capaz de identificar sangue de humano, galinha, camundongo, cavalo, gambá, capivara, porco, cachorro doméstico e cachorro do mato. Para validação da técnica, foram utilizados flebotomíneos capturados em Campo Grande (MS). Verificou-se que 68% dos insetos capturados alimentaram-se em galinha. Acreditamos que os resultados advindos deste projeto possam contribuir no desenho de futuras medidas de controle desta doença no Estado do Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: Leishmanioses. Identificação de leishmânia. Insetos vetores. Preferência alimentar. PCR. Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

PAIVA, B. R. " **PCR-based *leishmania* species and blood meal identification in sand flies (Diptera: Psychodidae) from Mato Grosso do Sul, Brazil.**" 144 p. *Thesis (Doctor of Philosophy)-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.*

Leishmaniasis protozooses have a high incidence in tropical regions such as Brazil and they are transmitted by sand fly vectors, their reservoirs consisting of different animal species. Flagellate forms in the vector are indistinguishable among the leishmania species as well as among other trypanosomatids. The disease presents a large spectrum due to the several leishmania species and also to different individual susceptibilities of hosts. Both for the individual prognosis as well as for epidemiological investigations in the future control measures of the disease the specific species identification is of crucial importance. An important factor in the causal net of the disease is knowledge of the vector's food source preferences, thus allowing an adequate intervention to control the spreading of the disease as well as of the reservoirs. Nowadays molecular techniques such as PCR allow an infection diagnosis, identification of the parasite infection in the vectors and hosts as well as the sand flies feeding habits. A significant increase of tegument and visceral leishmaniasis notifications was detected in Mato Grosso do Sul State (MS) and so far little is known about their etiology. In collaboration with Mato Grosso do Sul researchers we aim at the following goals, applying PCR techniques: determine the natural infections of field captured sand flies; identify leishmania species originating from human and canine isolates in hamsters; standardize the reaction to determine feeding source from sand flies captured in Campo Grande and Bela Vista.

For *leishmania* species identification mini-exon sequences were used as target and in cases positive for *Viannia* subgenus the RFLP was applied. For food source identification cytochrome b gene conserved regions were used as targets. Captures in Campo Grande were performed between 2003 to 2005. Between the years 2003 -2004 the minimum infection rate (MR) of 1.6% was found for *L.(V.) braziliensis*, while for the period 2004-2005 MR for *L.(L.) amazonensis* was 0.38% and the majority of sandfly species were identified as *Lu. longipalpis*. Five human isolates from Campo Grande and other municipalities were identified as *L.(V.) braziliensis*. The majority of specimens captured in Bela Vista municipality between 2004-2006 were *Bi. flaviscutelata*. From these a MR of 0.6% were identified as *L.(L.) amazonensis* and 0.24% for other Kinetoplastida species. From a total of 10 canine isolates 2 were identified as *L.(L.) amazonensis*. Standardization of PCR for food source identification was capable to distinguish the origin of several blood sources: human, chicken, mouse, horse, opossum, capybara, pig, domestic and bush dogs. Sandflies captured in Campo Grande (MS) were used to validate the technique. A percentage of 68% from these captures had fed on chicken. We believe that results shown in this project may contribute to the design of future control measures of this disease in the State of Mato Grosso do Sul.

Key words: Leishmaniasis. Identification of leishmania. Insect vectors Feeding preferences. PCR. Mato Grosso do Sul.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CDC- Centers for Disease Control

Cyt b- Citocromo b

Dde- *Desulfovibrio desulfuricans*

DNA- ácido desoxirribonucleico

DNAr- DNA ribossomico

DNTPs- deoxynucleosideo trifosfato

DTT- DL-dithiothreitol

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

ELISA- Ensaio imunoenzimático

FIOCRUZ- Fundação Instituto Oswaldo Cruz

FSP- Faculdade de Saúde Pública

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde.

G6pd- glicose-6-fosfatodehidrogenase

Gp63- glicoproteína 63

Hae- *Haemophilus influenza*

Hcl- ácido clorídrico

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB- Instituto de Ciências Biomédicas

IMTSP- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

kDNA- DNA de cinetoplasto

LPG -proteína de superfície lipofosfoglicana

LT- Leishmaniose Tegumentar

LVA- Leishmaniose Visceral Americana

LV- Leishmaniose Visceral

MgCl₂- cloreto de magnésio

mRNA- RNA mensageiro

MS- Mato Grosso do Sul

NaCl- Cloreto de sódio

Nco- *Nocardia corallina*

OMS- Organização Mundial de Saúde

pb- pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PG- *primers* para gênero *Leishmania*

pm- peso molecular

PV- *primers* para complexo *L. (V.) braziliensis*

RAPD- DNA polimórfico amplificado randomicamente

RCMEC- Regimento de Cavalaria Mecanizada

RFLP- Análise de seqüências polimórficas de DNA

RNA- ácido ribonucleíco

rpm- rotações por minuto

SDS- sulfato sódio dodecil

SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias

TAE- Tris acetato- EDTA

Taq- *Termus aquaticus*

TBE- Tri-Borato-EDTA

TE- Tris-EDTA

TM- taxa mínima de infecção

TRIS- Tris (hidroximetil) aminometano

UFMS- Universidade Federal do mato Grosso do Sul

USP- Universidade de São Paulo

UV- ULTRAVIOLETA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição Mundial da Leishmaniose Visceral.....	25
Figura 2. Distribuição Mundial da Leishmaniose Tegumentar.....	25
Figura 3. Ciclo de vida da Leishmânia.....	29
Figura 4. Flebotomíneo.....	30
Figura 5. Mapa do Estado do Mato Grosso do Sul.....	44
Figura 6. PCR-RFLP <i>Viannia</i>	68
Figura 7. Perfil de amplificação PG dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 1 ^o período.....	70
Figura 8. Perfil de amplificação <i>Viannia</i> (PV) dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 1 ^o período (A e B).....	71
Figura 9. PCR-RFLP flebotomíneos de Campo Grande-MS do 1 ^o período.....	72
Figura 10. Perfil de amplificação PG dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 2 ^o período.....	73
FIGURA 11. Mapa de Campo Grande com as localizações dos flebotomíneos infectados.....	74
Figura 12. Perfil de amplificação PG das amostras humanas.....	76
Figura 13. Perfil de amplificação PV das amostras humanas.....	77
Figura 14. PCR-RFLP amostras humanas.....	78
Figura 15. Perfil de amplificação PG flebotomíneos Bela Vista (MS).....	81
Figura 16. Perfil de amplificação PG dos isolados de cães de Bela Vista (MS).....	83

Figura 17. Perfil de amplificação PCR habito alimentar.....	85
Figura 18. RFLP <i>HaeIII</i> fontes alimentares.....	86
Figura 19. RFLP <i>DdeI</i> fontes alimentares.....	87
Figura 20. Padronização PCR Hábito alimentar de insetos.....	89
Figura 21. Perfil de amplificação hábito alimentar flebotomíneos de campo.....	90
Figura 22. RFLP <i>HaeIII</i> Hábito alimentar flebotomíneos de campo.....	91
Figura 23. RFLP <i>DdeI</i> Hábito alimentar flebotomíneos de campo.....	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose.....	23
1.2 Biologia do parasito.....	27
1.3 Flebotomíneos.....	29
1.4 Diagnóstico.....	34
1.5 Hábito Alimentar.....	40
1.6 Leishmaniose no Mato Grosso do Sul.....	43
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Descrição das Áreas: CAMPO GRANDE e BELA VISTA.....	51
3.1.1 Campo Grande.....	51
3.1.1.1 Pontos de captura dos flebotomíneos.....	52
3.1.2 Bela Vista.....	53
3.1.2.1 Local de captura.....	53
3.2 Amostragem.....	54
3.2.1 Flebotomíneos capturados em campo.....	54
3.2.2 Amostras de tentativas de isolamento.....	58
3.3 Técnicas Moleculares.....	59
3.3.1 Extração de DNA para identificação de Leishmânias.....	59

3.3.2 Identificação do gênero e espécies de leishmânias em tecidos e em flebotomíneos.....	60
3.3.2.1 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) para diferenciação de leishmânias do subgênero <i>Viannia</i>.....	62
3.4 Padronização da técnica de PCR para hábito alimentar.....	63
3.4.1 Repasto Sanguíneo.....	63
3.4.2 Vetores.....	63
3.4.3 Extração de DNA.....	64
3.4.4 Identificação de DNA das fontes de alimentação dos flebotomíneos.....	65
3.4.5 Clonagem e sequenciamento das fontes alimentares.....	66
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Padronização RFLP para subgênero <i>Viannia</i>.....	67
4.2 Identificação de Leishmânia.....	69
4.2.1 Flebotomíneos capturados em Campo Grande.....	69
4.2.2 Isolados de casos humanos de Campo Grande e outros municípios.....	75
4.2.3 Flebotomíneos capturados em Bela Vista.....	80
4.2.4 Isolados de cães de Bela Vista.....	82
4.3 Padronização hábito alimentar.....	84
4.3.1 Fontes alimentares.....	84
4.3.2 Validação da técnica em Insetos.....	88
4.3.3 Flebotomíneos capturados em campo.....	90

5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXO-SEQÜÊNCIAS (CLONAGEM).....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose

As leishmanioses constituem importante problema de saúde pública, sendo endêmicas em diversos países do mundo. São doenças parasitárias causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (BRYCESON, 1996).

Uma grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos como roedores, canídeos, edentados e marsupiais são hospedeiros vertebrados da *Leishmania*. Seus vetores compreendem insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos (GALATI, 1995). O homem é considerado, em geral, hospedeiro acidental pouco importante na manutenção do ciclo biológico, exceto nos casos notificados na Índia e em pacientes com AIDS na península ibérica (MOLINA, 1999).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, acometendo 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão expostas à infecção. Brasil, Índia, Bangladesh e Sudão são responsáveis por 90% dos casos notificados de leishmaniose visceral (Figura 1). Brasil, Peru e Bolívia respondem por 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa enquanto que Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose cutânea (Figura 2). As infecções

humanas são encontradas também em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Sua incidência vem aumentando para cerca de dois milhões de casos mundiais ao ano (World Health Organization, 2008).

No Brasil, casos de Leishmaniose são notificados em várias regiões geográficas, sendo encontrada atualmente em todos os Estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos. Ao longo do período de 1985 a 2003, 523.975 casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar foram notificados apresentando coeficientes de detecção entre 10,45 a 21,23 por 100.000 habitantes, com tendência ao crescimento e expansão para novos municípios. A região Norte apresenta coeficientes mais elevados (93,84/100.000hab.), seguidas pelas regiões Centro-Oeste (42,70/100.000hab.) e Nordeste (26,50/100.000 hab.). Entretanto, a maior frequência de notificação de doença encontra-se na região nordeste com 37,2%. A Leishmaniose Visceral que estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, atualmente encontra-se em franca expansão para grandes centros, distribuída em 19 estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, a média anual de casos foi de 3.383 casos com incidência de 2,0 casos/ 100 mil hab. Em 2003 a região Nordeste contribuiu com 65% dos casos no país (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).



Figura 1. Distribuição Mundial da Leishmaniose Visceral.



Figura 2. Distribuição Mundial da Leishmaniose Tegumentar.

Fonte: WHO, acesso 2009.

A doença relaciona-se com a atividade profissional à medida que o homem penetra em áreas florestais e em ambientes silvestres para

desmatamento, construção de estradas, açudes, garimpo etc., e dependendo de alguns fatores como contato com áreas onde há mosquitos, tipo de moradia e tempo de exposição às picadas dos mosquitos, está torna-se domiciliar (FALQUETO e SESSA, 1991; BRYCESON, 1996).

A parasitose afeta o sistema mononuclear fagocitário, apresentando uma variedade de síndromes e não apenas uma forma clínica (GARNHAM, 1987) Suas principais formas clínicas são: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT).

Atualmente as espécies de leishmânias que infectam o homem são classificadas em complexos e agrupadas em dois subgêneros: (*Viannia*) e (*Leishmania*) (HERWALDT, 1999).

São representantes do subgênero (*Viannia*) as leishmânias do complexo *L.(V.) braziliensis* e do subgênero (*Leishmania*) os complexos *L.(L.) mexicana* e *L.(L.) donovani* (MAGILL, 2000).

A leishmaniose visceral se manifesta por febre, cefaléia, anorexia, esplenomegalia e hepatomegalia, associada à desnutrição e possíveis problemas imunológicos. Quando não tratada precocemente, pode evoluir para óbito em 80 a 90% dos casos. No Brasil, a maioria dos casos, tem por agente etiológico a *L. (L.) infantum chagasi* (BRYCESON, 1996).

A leishmaniose tegumentar, no Brasil, geralmente é causada por 6 diferentes espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia* (*L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) lainsoni*), ocorre frequentemente em áreas expostas do corpo como face, membros e pescoço. No local da picada surgem lesões cutâneas que podem evoluir para diversas formas: cutânea localizada, disseminada, difusa e mucosa (NADIM FAHIH, 1968; AMATO, 1993).

O quadro clínico e a evolução dependem da espécie causadora e da condição imunológica do hospedeiro (FALQUETO e SESSA, 1991).

1.2. Biologia do parasito

O protozoário leishmânia é transmitido quase que exclusivamente pela picada do mosquito flebotomíneo (GREVELINK e LERNER, 1996).

Estes agentes apresentam duas formas durante o seu ciclo de vida: a forma amastigota oval ou arredondada de 2 a 5 μm , sem flagelo exterior, com um núcleo e cinetoplasto, de vida intracelular, encontradas em hospedeiros vertebrados e as formas promastigotas de corpo móvel e delgado de 10 a 20 μm x 1.5 a 3.5 μm , com flagelo anterior de comprimento semelhante, citoplasma delimitado por membrana

trilaminar, contendo núcleo, corpo basal e cinetoplasto, encontradas em hospedeiros invertebrados e em meios de cultura artificiais. As características morfológicas das formas promastigotas são muito similares entre as várias espécies o que impede sua correta identificação sob microscopia óptica (MAGILL, 2000).

As formas amastigotas ingeridas no repasto sanguíneo pelo flebotomíneo transformam-se em promastigotas no interior do seu tubo digestivo. Durante 4 a 7 dias, estas escapam da matriz peritrófica, migram até as porções anteriores do intestino, começando um processo de diferenciação e multiplicação até sua maturação, onde pode-se observar a presença das formas metacíclicas infectantes migrando até a proboscíde do inseto que serão inoculadas no próximo repasto sanguíneo (SACKS e KAMHAWI, 2001). No mamífero, após a penetração macrofágica e formação do vacúolo parasitóforo as promastigotas se diferenciam em amastigotas, multiplicam-se por divisão binária, rompem a célula, liberando milhares de formas amastigotas que serão fagocitadas por novas células. Estas células infectadas podem se multiplicar gerando células filhas infectadas. Um novo hospedeiro vetor ao promover seu repasto neste mamífero ingere estas formas amastigota, reiniciando o ciclo (Figura 3) (BRYCESON, 1996; ASHFORD, 2000).

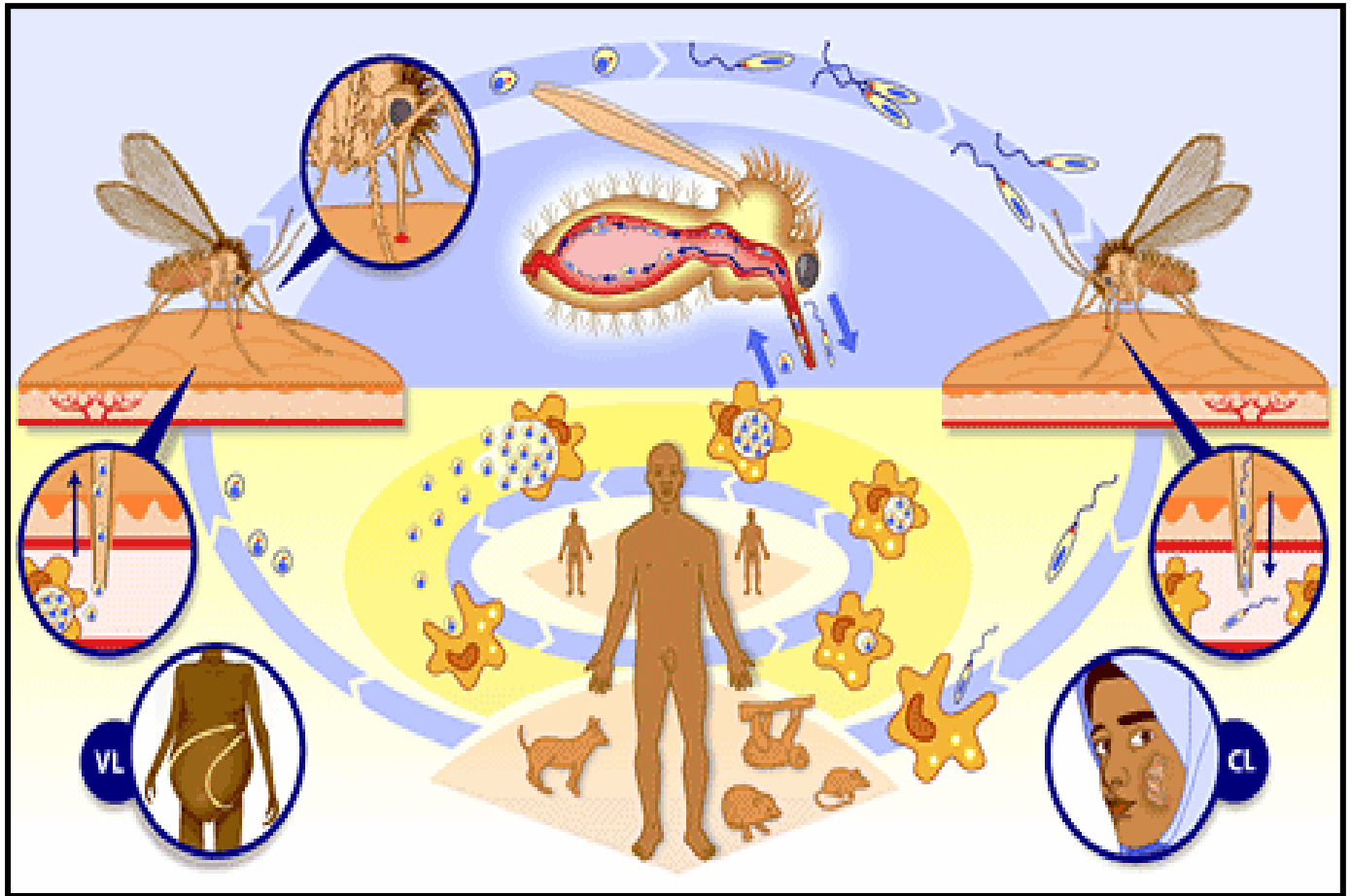


Figura 3. Ciclo de vida da Leishmânia.

Fonte: www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/LifeCicle.html.

1.3 FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae.

Este vetor possui 1-4 mm de comprimento é piloso, cor de palha ou castanho claro (Figura 4), seu vôo é curto, baixo e saltitante, encontrado

em áreas temperadas e intertropicais, não se afastam muito de seus criadouros, mesmo podendo se deslocar até cerca de 1 km, a maioria não vai além de 250 m (YOUNG e DUNCAN, 1994; CASANOVA *et al*, 2005).

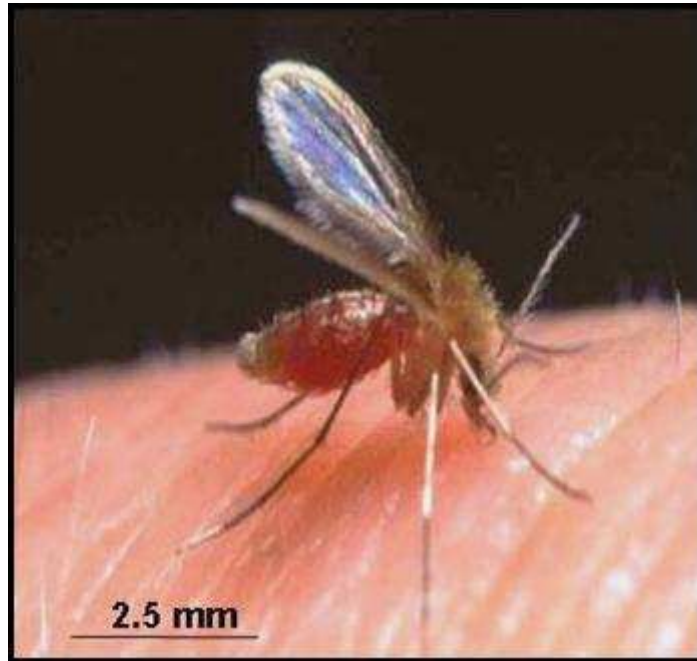


Figura 4. Flebotomíneo.

Fonte: www.mundoeducacao.com.br/doencas/leishmaniose-1.htm.

Tanto as fêmeas quanto os machos podem alimentar-se de seiva e sucos vegetais, porém só a fêmea é hematófaga e seu repasto sangüíneo pode ser feito em diversos vertebrados (mamíferos, aves, répteis e anfíbios). O sangue ingerido serve como fonte de proteínas e aminoácidos para estimular a oviposição. O número de ovos produzidos está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido (READY, 1979). Normalmente promovem um único repasto, mas em algumas espécies

foram observados dois repastos antes da oviposição; tal comportamento ocorreria pelas variações climáticas, altas temperaturas e baixa umidade, prejudicando a oviposição, sendo necessário um segundo repasto para reposição hídrica (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

A cada oviposição a fêmea deposita entre 40-70 ovos e suas larvas desenvolvem-se em criadouros ricos em material orgânico, calor, umidade e ao abrigo de luz. O ciclo completo dura cerca de 30 a 90 dias e a fase adulta compreende de 15 a 30 dias (CIMERMAN, 1999). A atividade da fêmea geralmente se inicia ao entardecer e se prolonga até o começo da madrugada, entretanto algumas espécies podem picar também durante o dia (WHO-OMS, 1998). As diferentes espécies de flebotomíneos possuem habitats e hábito alimentar preferenciais. Sua diversidade encontra-se nas florestas tropicais, mas também em ambientes modificados, como áreas de cultivo e urbanização. (YOUNG e DUNCAN, 1994).

Cerca de 900 espécies estão distribuídas pelos continentes. Das 470 espécies conhecidas nas Américas, 60 são reconhecidas como vetoras ou vetoras em potencial. As vetoras reconhecidas apresentam distribuição geográfica que coincide com a da doença, existem em alta densidade, são antropofílicas, têm contato com reservatórios, infectando-se e transmitindo o parasito ao passo que as vetoras em potencial são capturadas nas áreas endêmicas, muitas vezes em simpatria com as demais, porém até o momento, estas não foram encontradas infectadas

naturalmente, restando-nos apenas o encontro de evidências epidemiológicas (KILLICK – KENDRICK, 1981; CIPA GRUOP, 1999). Dois gêneros apresentam maior importância na epidemiologia da leishmaniose: *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (REY, 2001).

O ciclo de vida das várias espécies de leishmânia no vetor é semelhante, mas existem diferenças quanto à distribuição da infecção em seu tubo digestório. No subgênero (*Viannia*) as promastigotas colonizam todo o intestino, incluindo piloro e íleo, permanecendo aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal onde se dividem e migram através do estômago em direção ao aparelho bucal, sendo esta distribuição denominada peripilária. Já no subgênero (*Leishmania*), apresentando distribuição suprapilária, multiplicam-se aderidas ou não às paredes do estômago, colonizando também o esôfago e faringe. O tempo necessário para que o ciclo se complete varia entre 3 a 5 dias dependendo das espécies envolvidas (SHAW e LAINSON, 1987).

Existem evidências de que as interações entre os flebotomíneos e as leishmânias possuam um caráter espécie específico (Quadro 1) (KILLICK-KENDRICK, 1985).

Quadro- 1 Espécies vetoras freqüentes no Brasil.

Leishmânia	Vetor
<i>L.(L.)infantum chagasi</i>	<i>Lutzomyia. longipalpis</i>
<i>L. (L.)amazonensis</i>	<i>Bichromomyia. flaviscutelata</i>
<i>L.(V.)braziliensis</i>	<i>Nyssomyia whitmani,</i> <i>Psychodopygus wellcomei,</i> <i>Migonemyia migonei e Nyssomyia</i> <i>intermedia</i>
<i>L.(V.)guyanensis</i>	<i>Nyssomyia umbratilis, Nyssomyia</i> <i>anduzi e Nyssomyia whitmani</i>
<i>L.(V.)naiffi</i>	<i>Psychodopygus ayrozai,</i> <i>Psychodopygus paraensis</i>
<i>L. (V.)shawi</i>	<i>Nyssomyia whitmani</i>
<i>L.(V.)lainsoni</i>	<i>Lu.ubiquitalis</i>

Fonte: PETERS, W. e KILLICK-KENDRICK (1987).

Para que o completo desenvolvimento da leishmânia ocorra no vetor, esta tem que transpor diversas barreiras tais como: susceptibilidade às enzimas digestivas do inseto, incapacidade de escape da matriz peritrófica, ineficiência na ligação da forma promastigota as células epiteliais do intestino e diferenciação defeituosa prejudicando a migração das formas metacíclicas infectantes. O inseto vetor, por sua vez, não sairá ileso visto que as leishmânias, ao romper estas barreiras, acabam por inibir a ação

de suas enzimas digestivas e as formas metacíclicas acabam por danificar sua válvula esofágica, prejudicando funções como, digestão, oviposição, alimentação entre outros (SACKS e KAMHAWI, 2001; KAMHAWI, 2006).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em características clínicas e epidemiológicas. Testes parasitológicos, no caso da leishmaniose visceral, são realizados a partir de material coletado de sangue periférico ou aspirado de medula óssea, baço, líquido ou biópsia, sendo que a quantidade de parasitas em cada tecido varia muito. O método que apresenta maior sensibilidade é a análise do material obtido de baço, porém o procedimento é associado a vários riscos para o paciente. Desta forma, o material mais utilizado é o aspirado de medula óssea, que apresenta entre 65% a 85% de sensibilidade. Também são utilizados os métodos imunológicos, como a sorologia e a reação cutânea de Montenegro, porém não possibilitam diferenciar entre doença ativa e um contato prévio sem doença no momento do exame (BRYCESON, 1996). A detecção da infecção por PCR (polymerase chain reaction) é vantajosa, pois pequena quantidade de material aspirado é necessária (2.5 a 5.0 ml) enquanto que, para a visualização direta do parasito, devido à baixa carga parasitêmica, são necessários 50 a 500ml de aspirado (WEISS, 1995).

O diagnóstico de leishmaniose cutânea é baseado em características clínicas tais como: número de lesões (se indolores e não pruriginosas), áreas de exposição, tempo de evolução e resistência medicamentosa. Testes laboratoriais confirmatórios raramente são utilizados, pois ficam restritos a alguns laboratórios de referência (AVILES *et al.*, 1999; GREVELINK e LERNER, 1996).

Métodos clássicos como análise microscópica e isolamento do parasito “in vitro” ou “in vivo”, são difíceis e imprecisos, pois consomem tempo e pessoal treinado (MAGILL, 2000).

Atualmente os métodos mais utilizados para o diagnóstico destas doenças são visualizações diretas por meio de esfregaços ou “imprinting” de tecido ou exame histopatológico da pele. O tecido é obtido por aspiração da lesão ou biópsia. Este também pode ser inoculado em hamsters (BRYCESON, 1996) embora a sensibilidade do método seja baixa. O diagnóstico microscópico também possui o inconveniente de possuir baixa sensibilidade, pois geralmente o número de parasitos nas lesões cutâneas é baixo e nas mucosas é menor ainda. Algumas destas técnicas foram aprimoradas pelo uso de imunohistoquímica (HANHAM *et al.*, 1991). Outros métodos diagnósticos tais como a Reação de Montenegro e os sorológicos também são utilizados. A reação de Montenegro parece ser útil para diagnóstico em áreas não endêmicas (GREVELINK e LERNER, 1996).

A sorologia, realizada pelo método de ELISA (Ensaio imunoenzimático), exibe baixa sensibilidade e especificidade (SANCHEZ *et al.*, 1992; GARCIA-MISS *et al.*, 1990) já que não diferencia doença presente de passada, ou doença clínica de infecção subclínica, geralmente exibindo resultados falsos em imunocomprometidos, além do inconveniente de apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (PIÑERO *et al.*, 1999).

Por tudo o que foi relatado anteriormente, devemos ressaltar a importância da identificação das várias espécies de leishmânias no prognóstico individual, bem como nas investigações epidemiológicas levando-se em conta futuras medidas de controle desta doença (GREVELINK e LERNER, 1996).

Nos últimos anos, técnicas moleculares foram utilizadas como ferramenta para um diagnóstico mais rápido, sensível e específico e a técnica de PCR, “polymerase chain reaction” ou reação em cadeia de polimerase, foi descrita em vários trabalhos como eficaz na detecção e identificação de leishmânias (UEZATO *et al.*, 1998). Como exemplo, alguns autores reportaram sensibilidade variando de 80% a 100%, com especificidade de 100% (DEGRAVE, 1994).

Esta técnica foi descrita associada ao ELISA (PCR-ELISA) por Piñero *et al.* (1999), obtiveram sensibilidade de 83% em amostras sanguíneas de pacientes com leishmaniose cutânea e nenhum falso positivo foi observado. Aviles *et al.* (1999) utilizando cultura de leishmânias como padrão ouro, compararam a técnica de PCR com outros métodos diagnósticos usuais. A sensibilidade da PCR foi de 92% enquanto que para microscopia, detecção histológica e ELISA obtiveram a sensibilidade de respectivamente 42%, 33% e 20%. Além disto, conseguiram identificar a espécie do parasito. Também Belli *et al.* (1998), utilizando material de escarificação dérmica, demonstraram maior sensibilidade com uso de PCR em relação às técnicas usuais obtendo 100% de sensibilidade e especificidade. Os autores conseguiram identificar *Leishmania (V.) braziliensis* em células mononucleares de indivíduos com lesões cutâneas ativas, por meio desta técnica. Pirmez *et al.* (1999) utilizaram PCR e hibridização, obtendo importante diferença na sensibilidade diagnóstica quando comparado com o isolamento de leishmânias a partir de lesões mucosas: 71% pelo PCR e 17% por técnicas convencionais.

As seqüências-alvo escolhidas para PCR foram inicialmente os mini-círculos de kDNA (RODGERS *et al.*, 1990), ideais para a amplificação do DNA, pois estão presentes no cinetoplasto da *Leishmania* em grande número de cópias e contêm uma região conservada de no mínimo 120 pares de bases que podem ser evidenciadas em cada molécula (WEIGLE *et al.*, 2002).

No intuito de obter maior sensibilidade e especificidade, são também utilizados marcadores que amplificam aleatoriamente seqüências de DNA (RAPD) (WILLIAMS *et al.*, 1990), genes de RNA ribossômico (ULIANA *et al.*, 1994); seqüências genômicas repetitivas (RODRIGUEZ *et al.*, 1997); genes de RNA derivados de mini-exon utilizados para diferenciação de leishmânias do Velho e Novo Mundo (VAN EYS *et al.*, 1992; FERNADEZ *et al.*, 1994; HARRIS *et al.*, 1998) e o gene da Glucose-6-Fosfatase Desidrogenase (G6PD) que identifica espécies de *Leishmania* (CASTILHO *et al.*, 2003). O método também pode ser associado com outras técnicas como PCR-ELISA (SANCHES *et al.*, 2001) e PCR-RFLP (VOLPINI *et al.*, 2001).

Para fins epidemiológicos e de programas de controle de Leishmaniose, a identificação taxonômica do agente etiológico no inseto vetor é de extrema importância clínica e o uso de técnicas moleculares como a PCR, está permitindo grandes avanços na sensibilidade e identificação do parasito (CABRERA *et al.*, 2002).

A pesquisa de flagelados no tubo digestório do vetor e reconhecimento da espécie, normalmente é feita por microscopia, após dissecação segundo protocolo de Johnson e colaboradores (SILVA *et al.*, 2001) ou tentativa de isolamento do agente. Apesar de pequenas diferenças na localização do parasito no tubo digestivo do vetor, estes

parasitos assumem formas flageladas indistinguíveis entre as espécies de leishmânia, bem como de outras espécies de flagelados, como *Crithidia*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum* (NEVES 1991), o que complica a identificação da leishmânia no vetor.

O uso da PCR aumentou a sensibilidade e especificidade de identificação do parasito (CABRERA *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos utilizando primers de kDNA identificaram menos de três parasitos por flebotomíneo (ARANSAY *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2002). Jorquera *et al.* (2005) encontraram flebotomíneos naturalmente infectados por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) mexicana* na Venezuela. Utilizando a técnica de PCR, Cáceres *et al.* (2004), puderam incriminar, a espécie *Lutzomyia ayacuchensis* como único vetor de leishmânia do subgênero *Viannia* nos Andes. Em um surto epidêmico na Índia (1990-1992) a presença de DNA de *Leishmania (L.) donovani* em vetores foi detectada pela reação de PCR, tendo como alvo seqüências de mini-exon e gpG3 mRNA (MUKHERJEE *et al.*, 1997). Por meio de amplificações, a partir de seqüências de mini-exon, demonstrou-se que isolados de *Lutzomyia tuberculata* no Pará pertenciam ao subgênero *Viannia* (BRAGA *et al.*, 2003). *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *L.(L.) amazonensis* também foram identificadas em insetos de campo capturados em Dourados (MS), utilizando-se seqüências de mini-exon (PAIVA *et al.*, 2006).

Em nossos estudos, para a identificação de DNA de leishmânia, utilizamos seqüências deduzidas a partir de regiões do mini-exon encontrada em todos os *Kinetoplastida*. Esta região apresenta cerca de 100 a 200 cópias no genoma nuclear, constituído de três partes: um exon que é altamente conservado entre as espécies, um intron moderadamente conservado entre as espécies pertencentes ao mesmo subgênero e uma região intergênica mais divergente entre as espécies, sendo ausente em hospedeiros vertebrados ou invertebrados (FERNANDES *et al.*, 1994) considerada ideal para diagnóstico, sendo capaz de distinguir as várias espécies de leishmânia e outros tripanosomatídeos (PAIVA *et al.*, 2006).

1.5 Hábito Alimentar

Uma vez que a circulação das leishmânias de um mamífero a outro, na natureza, é assegurada pela atividade alimentar dos flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK e WARD, 1981), o estudo de seu conteúdo estomacal é de grande significado ecológico e epidemiológico, pois além de permitir descobrir sua preferência alimentar, pode também fornecer subsídios para a indicação de reservatórios potenciais de leishmaniose e o possível papel protetor ou atrativo que certos animais poderiam desempenhar em relação ao homem na área de transmissão destes parasitos (FERREIRA, 1945).

Métodos imunológicos para detecção de sangue ingerido em artrópodes são utilizadas desde 1900, quando a técnica de precipitina foi adaptada para a determinação da fonte alimentar em mosquitos e outros insetos. A técnica imunoenzimática (ELISA), foi posteriormente adaptada ao estudo do hábito alimentar em culicídeos, tornando-se uma alternativa para a identificação de sangue ingerido (EDRISSIAN e HAFIZI, 1982) e esta vem sendo aperfeiçoada ao longo dos anos (BLACKWELL *et al.*, 1995; GOMES *et al.* 2001; MWANGANGI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2008b).

Vários métodos são utilizados para identificar ao nível de espécie a fonte alimentar dos insetos. Ensaio imunológicos (teste de precipitação, difusão em gel e ELISA) são amplamente utilizados, entretanto estas técnicas apresentam a possibilidade de reações cruzadas, requerem a produção de anticorpos específicos para as potenciais fontes e são incapazes de apontar reservatórios não esperados (HAOUAS *et al.*, 2007; CHOW *et al.*, 1993).

Dada a problemática da detecção de proteínas em pequenas quantidades de sangue ingerido, técnicas moleculares, como a PCR, foram adaptadas à identificação das possíveis fontes alimentares, fornecendo assim, informações aos estudos de hábito alimentar de insetos vetores, incluindo carrapatos (ESTRADA - PEÑA *et al.*, 2005), triatomíneos (BOSSENO *et al.*, 2006), culicídeos, entre outros (KENT e NORRIS 2005; MOLAEI *et al.*, 2008). Mais recentemente a identificação de hábito

alimentar por PCR está sendo utilizada em flebotomíneos, com o uso do gene prepronociceptin (HAOUOS *et al.*, 2007) e regiões do citocromo b (SANT'ANNA *et al.*, 2008).

Muitos pesquisadores utilizam marcadores de genes mitocondriais tais com o citocromo b (*cyt b*) para detecção de hábito alimentar de vários vetores (COULSON *et al.*, 1990; KIRSTEN e GRAY, 1996; KENT e NORRIS, 2005; MOLAEI, *et al.*, 2008). Entre as vantagens deste marcador, está sua localização no genoma mitocondrial (que não sofre recombinação) e a disponibilidade de seqüências completas no “Genbank”, permitindo uma comparação extensa entre as espécies (PERKINS e SCHALL, 2002). Alguns protocolos são baseados também em trabalho anterior de Irwin *et al.* (1991), onde os autores descrevem primers capazes de amplificar o gene *citocromo b* de vários mamíferos.

Quando se trabalha com quantidades pequenas de DNA, o DNA mitocondrial torna-se molécula valiosa já que um número irregular de mitocôndrias pode estar presente em uma única célula, ocupando até 17% do volume total da célula. Embora os eritrócitos imaturos percam suas mitocôndrias durante os estados finais de maturação, outras células sanguíneas como leucócitos e mesmo o tecido epitelial, contribuem com números significativos de mitocôndrias (TYLER, 1992).

1.6 Leishmaniose no Mato Grosso do Sul

O Estado do Mato Grosso do Sul, está situado ao sul da região Centro Oeste do Brasil, possui área total de 358.158,7 km² e população de 2.265.813 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, janeiro de 2009). Tem a cidade de Campo Grande como sua capital e é composto por 78 municípios (Figura 5), fazendo fronteira a oeste com a Bolívia, a oeste e sul com o Paraguai, limita-se a leste com Minas Gerais e São Paulo, ao sul com o Estado do Paraná e ao norte com Mato Grosso e Goiás (GOVERNO DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, 2009).



Figura 5. Mapa do Estado do Mato Grosso do Sul.

Fonte: br.geocities.com/serraverde/pantanal/foto/mapa_municipios.gif.

Dados de literatura apontam a presença de leishmaniose visceral em Mato Grosso, hoje Mato Grosso do Sul, desde o início do século XX, uma vez que o primeiro caso humano autóctone do continente americano,

diagnosticado em 1913, em Assunção, era procedente de Porto Esperança, município de Corumbá, MS (MIGONE, 1913; DEANE, 1956). Foram registrados, ainda, casos esporádicos da doença na zona rural de outros municípios, no transcorrer do século (ARRUDA *et al.*, 1949; CHAGAS e CHAGAS, 1938; OLIVEIRA, 1938).

Desde o início da década de 80, a presença de LV é notificada em Mato Grosso do Sul (MS), nos municípios de Ladário e de Corumbá, juntamente com a ocorrência de cães com aspectos sugestivos da doença, sendo diagnosticada infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em 8,7% de 481 cães examinados (NUNES *et al.*, 1988). Em anos mais recentes, a doença vem atingindo os municípios de Dois irmãos do Buriti, Bodoquena, Miranda, Aquidauana, Anastácio, Antônio João e Campo Grande (NUNES *et al.*, 2001).

A partir de 1995 observa-se um processo lento de expansão da doença, abrangendo 11 municípios dos quais Aquidauana e Anastácio distam 270km de Corumbá. Em 1999 foram notificados 61 casos, com 9 óbitos e metade das notificações em crianças com menos de 10 anos (CORTADA *et al.*, 2004).

Nos anos posteriores, a leishmaniose visceral continua seu processo de expansão. Em 2007, 41 municípios haviam sido atingidos pela doença, sendo Campo Grande, Três Lagos, Aquidauana, Corumbá, Anastácio e

Brasilândia classificados como de transmissão intensa; Miranda e Terenos como transmissão moderada e o restante classificados como transmissão esporádica (MATO GROSSO DO SUL, 2007).

Em 2002 surgiram as primeiras notificações de LV humana autóctone em Campo Grande, com 19 casos confirmados. Atualmente, a capital apresenta o maior número de casos, em 2006 foram confirmados 165 casos com 11 óbitos, sendo registrados em 2007, 142 casos da doença, acometendo populações rurais e urbanas, jovens e adultos (MATO GROSSO DO SUL, 2007).

Com relação à fauna flebotomínea em Corumbá as espécies mais encontradas foram *Lutzomyia cruzi* seguida por *Lutzomyia forattini* e *Evandromyia corumbaensis*, encontradas no intra e peridomicílio e com elevada antropofilia no caso das duas primeiras espécies, sugerindo a participação destas na veiculação da leishmânia (GALATI *et al.*, 1997). Em 1998, nesta mesma área, foram encontradas *Lu. cruzi* naturalmente infectadas e em 2003 a presença de *Lu. longipalpis*, acrescentou uma nova variável na epidemiologia da doença (SANTOS *et al.*, 1998, 2003).

Oliveira *et al.* (2003) demonstraram a presença desta espécie comprovadamente vetora de LV, na área urbana, ocorrendo em simpatria com *Lu. cruzi*, que demonstraram evidências de transmissão em Corumbá e Ladário (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2003).

Nos últimos anos é evidente a adaptação de *Lu. longipalpis* em áreas urbanas, como Campo Grande (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Apesar do crescente número de casos, o conhecimento de vários aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar no Estado ainda é incipiente. De acordo com a Secretaria do Estado do Mato Grosso do Sul, casos de LT são notificados desde 1975 e atingem quase todos os 78 municípios, com maior incidência em Aquidauana, Bodoquena, Bonito, Campo Grande, Coxim e Nioaque, o estado apresentou 4.567 casos da doença confirmados de 1990 a 2008 (SINAN/SVS/MS, 2008).

Nunes *et al.* (1995) e em 2001, identificaram em Corguinho e em Bonito respectivamente, a presença de *L.(V.) braziliensis* em áreas de ocorrência da doença, mas desconhecem a real etiologia da maioria dos casos de LT em Mato Grosso do Sul. A doença acometeu ambos os sexos, com predomínio do sexo masculino, com idade acima de 20 anos e procedentes de área rural.

Ressalta-se a identificação de *Leishmania (L.) amazonensis* em área de treinamento militar no ano de 2001, com o diagnóstico de nove casos da doença em militares procedentes do município de Bela Vista (DORVAL *et al.*, 2006), revestindo-se de importância este achado, não só pela diversidade e gravidade das formas clínicas na parasitose causada por esta espécie, assim como pela expansão geográfica de sua área de

ocorrência.

Em Campo Grande, os casos notificados como autóctones sugerem a ocorrência de transmissão urbana, mas é possível que ocorra confusão na interpretação do local de infecção (YARZON *et al.*, 2003).

Em estudos de fauna, Galati *et al.* (1996), encontraram em Corguinho e Assentamento Guaicurus, município de Bonito, *Nyssomyia whitmani* como espécie mais abundante em todos os ecótopos, sendo atribuído a esta espécie o papel de vetora de LT por sua elevada antropofilia, juntamente com o encontro de flagelados no intestino médio e posterior com taxa de infecção de 0,16%, em área de encontro de *L.(V.) braziliensis* (NUNES *et al.*, 1995).

No município de Campo Grande, Oliveira *et al.* (2003), relataram a ocorrência de três espécies incriminadas como vetoras de LT, *Ny. whitmani*, *Bichromomyia flaviscutelata* e *Migonemyia migonei*, capturadas em área urbana.

Dorval (2006) em estudos epidemiológicos no município de Bela Vista, constatou a presença de *Bi. flaviscutelata* (vetor de *L. (L.) amazonensis*), assim como as espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani*.

Em Mato Grosso do Sul, assim como em outras áreas brasileiras, tanto a forma tegumentar como a visceral de leishmaniose encontram-se em processo de expansão geográfica.

Sendo assim, a fim de se verificar a infecção natural dos flebotomíneos e identificar as espécies de leishmânias em isolados de pacientes e de cão, pelas várias espécies de leishmânias que circulam nas áreas do Mato Grosso do Sul, utilizaremos a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR). Para avaliar a epidemiologia e ecologia dos vetores pretendemos padronizar uma técnica de PCR capaz de identificar a fonte alimentar de flebotomíneos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar a infecção natural por leishmânias em vetores e material biológico do estado do Mato Grosso do Sul assim como padronizar a identificação do hábito alimentar em espécies de flebotomíneos

2.2 ESPECÍFICOS

Identificar gênero e espécie de leishmânias em:

- a) flebotomíneos capturados em campo;
- b) amostras humanas e caninas isoladas em hamster, por meio da técnica de PCR;
- c) padronizar, por meio da técnica de PCR, metodologia capaz de identificar o hábito alimentar de flebotomíneos capturados em campo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição das Áreas: CAMPO GRANDE E BELA VISTA

Grande parte do material utilizado neste projeto é proveniente da área urbana do município de Campo Grande e do município de Bela Vista, Estado do Mato Grosso do Sul.

3.1.1 Campo Grande

Campo Grande, com 8.096 km², está localizado na porção central do Mato Grosso do Sul, ocupando 2,26% da área total do Estado e com 747.189 habitantes. Segundo dados do IBGE (2008), suas coordenadas geográficas são 20^o 26' 34" latitude Sul e 54^o 38' 47" longitude Oeste, e sua altitude varia entre 500 e 675 metros. A capital localiza-se na zona neotropical pertencente aos domínios da região fitogeográfica do Cerrado, o clima predominante é do tipo tropical chuvoso de Savana, sub-tipo AW (classificação de Köppen), com período definido de seca durante meses mais frios (média 18 °C) e um período chuvoso durante meses mais quentes, aproximadamente 25 °C.

3.1.1.1 Pontos de captura dos flebotomíneos

As coletas foram realizadas em três regiões da capital com armadilhas tipo CDC (CENTER OF DISEASES CONTROL) no período de dezembro de 2003 a novembro de 2005, sendo estas:

Região Oeste: denominada de Mata do Zé Pereira, localizada na Vila do Zé Pereira, bairro criado por programa de desfavelamento;

Região Sul, Chácara Wood, Jardim Monte Alegre;

Região Central, Vila Bandeirantes.

Os locais das capturas compreendem áreas de mata residual, próximos a residências, peridomicílio (várias espécies de árvores frutíferas, galinheiro, canil) e intradomicílio (casa de alvenaria), cujos critérios de seleção basearam-se na densidade e diversidade de flebotomíneos adquiridos a partir de estudos realizados por Oliveira *et al.* (2008a).

3.1.2 Bela Vista

O município de Bela Vista situa-se na parte sudoeste do Mato Grosso do Sul, dista 349 Km de Campo Grande, ocupando uma área de 5.315 Km² e com população em torno de 22.868 habitantes (IBGE, 2008). Suas coordenadas geográficas são latitude Sul 22^o 06' 32" e longitude Oeste 56^o 31' 16". Atualmente 80% do município está ocupado por atividades agrícolas e pecuaristas, restando apenas algumas formações do tipo Floresta Estacional Semidecidual.

3.1.2.1 Local de captura

As capturas neste município deram-se no 10^o Regimento de Cavalaria Mecanizada (RCMEC), localizado nesta área desde 1906, com 200 hectares, margeado pelo Córrego Candelão, onde cerca de 50 hectares são utilizados como centro de instrução para atividades de treinamento diurno e noturno. As capturas foram realizadas no período de fevereiro de 2004 e janeiro de 2006, na mata (vegetação arbórea densa com pontos sujeitos a alagamento), utilizando armadilhas automáticas luminosas tipo CDC e Disney como também barraca Shannon (SHANNON 1939).

A escolha do local de captura e estudos entomológicos foi realizada por Dorval (2006).

3.2 Amostragem

3.2.1 Flebotomíneos capturados em campo

As várias espécies de flebotomíneos utilizadas para identificação molecular de leishmânias foram fornecidas pelas Profas. Maria Elizabeth M. C. Dorval e Alessandra G. de Oliveira do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo capturados em Campo Grande e Bela Vista, áreas onde casos de Leishmaniose Tegumentar e Visceral foram notificados. A nomenclatura adotada para a identificação dos insetos foi a preconizada por Galati (2003).

Amostragem de Campo Grande:

Dos 2.638 insetos capturados, a grande maioria foi identificada como *Lutzomyia longipalpis*. As demais espécies foram capturadas em menor número e foram as seguintes: *Nyssomyia antunesi*, *Micropygomyia quinquefer*, *Psathyromyia aragaoi*, *Ps. clautrei*, *Ps. hermanlenti*, *Pintomyia christenseni*, *Pi. damascenoi*, *Evandromyia termitophila* e *Ev. cortelessi* (Quadro 2).

Amostragem de Bela Vista:

Obteve-se 825 insetos, sendo a maioria pertencente à espécie *Bichromomyia flaviscutelata*. As demais, em menor número foram: *Brumptomyia brumpti*, *Ev. aldafacae*, *Ev. bourrouli*, *Ev. corumbaensis*, *Ev. sallesi*, *Ps. punctigeniculata* (Quadro 3).

Outras espécies comuns às duas áreas também nos foram enviadas: *Lu. longipalpis*, *Bi. flaviscutelata*, *Br. sp*, *Br. avellari*, *Ev. lenti*, *Ev. teratodes*, *Sciopemyia sordelli*, *Ny. whitmani*, *Ps. campograndensis* e *Ps. shannoni*.

Quadro 2- Espécies de flebotomíneos utilizados para identificação molecular de leishmânia de Campo Grande (MS), capturadas nos períodos de 2003-2004 e 2004-2005.

Espécies	Número (2003-2004)	Número (2004-2005)
<i>Lu. longipalpis</i>	427	1722
<i>Ev. termitophila</i>	24	69
<i>Ny. antunesi</i>	1	55
<i>Ps. clausurei</i>	38	33
<i>Os. hermanlenti</i>	13	30
<i>Ev. lenti</i>	16	29
<i>Ps. aragaoi</i>	8	27
<i>Ny. whitmani</i>	11	25
<i>Mi. quinquefer</i>	5	23
<i>Pi. christenseni</i>	4	33
<i>Ev. cortelessi</i>	5	9
<i>Ps. shannoni</i>	4	5
<i>Ps. campograndensis</i>	4	3
<i>Br. sp</i>	2	0
<i>Sc. sordelli</i>	1	1
<i>Bi. flaviscutellata</i>	0	2
<i>Pi. damascenoi</i>	0	2
<i>Ev. teratodes</i>	0	1
<i>Br. avellari</i>	0	6
TOTAL	563	2075

Fonte: Profa. Alessandra G. de Oliveira do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Quadro 3- Espécies de flebotomíneos utilizados para identificação molecular de leishmânia de Bela Vista (MS), capturadas entre 2004 e 2006.

Espécies	Número
<i>Bi. flaviscutelata</i>	448
<i>Ev. bourrouli</i>	98
<i>Ps. punctigeniculata</i>	75
<i>Ev. lenti</i>	51
<i>Br. brumpti</i>	43
<i>Ps. shannoni</i>	39
<i>Lu. longipalpis</i>	34
<i>Br. avellari</i>	16
<i>Sc. sordelli</i>	7
<i>Ps. campograndensis</i>	3
<i>Br. sp</i>	3
<i>Ny. whitmani</i>	2
<i>Ev. corumbaensis</i>	2
<i>Ev. sallesi</i>	1
<i>Ev. aldafacae</i>	1
<i>Ev. teratodes</i>	1
TOTAL	825

Fonte: Profa. Maria Elizabeth M. C. Dorval do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Os flebotomíneos foram recebidos mortos em “pools” de 2 a 10 insetos/tubo tipo eppendorf e alguns nos foram enviados individualmente. Estes estavam imersos em isopropanol e foram mantidos a 4°C até o processamento. A taxa mínima de infecção natural destes insetos foi calculada pela fórmula: $TM = \frac{n^{\circ} \text{ de grupos positivos ("pool")}}{n^{\circ} \text{ total de insetos}} \times 100$ (PAIVA *et al.*, 2006).

A constituição dos “pools” foi realizada de acordo com a espécie, local e data de captura.

A nomenclatura adotada está de acordo com classificação de Galati (2003).

3.2.2 Amostras de tentativas de isolamento

Todas as amostras foram coletadas com consentimento prévio dos pacientes. Estes protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os aspirados e biópsias humanas são em sua maioria provenientes de Campo Grande e de alguns municípios vizinhos da Capital do MS.

Após passarem por avaliação clínica, os pacientes foram encaminhados ao laboratório de Parasitologia da UFMS, onde sangue medular e biópsia de lesão foram semeadas em culturas e inoculadas em hamster. Estes animais permaneceram no laboratório sob observação pelo período de 4 a 6 meses, nos casos suspeitos de LV, e aproximadamente 1 ano para LT.

As amostras dos cães provêm de Bela Vista (10^o Regimento Militar), onde foram realizados, para fins de pesquisa, aspirados de medula e linfonodo como também biópsia de pele. Após eutanásia dos animais, os fragmentos de fígado, baço e linfonodo foram recolhidos e realizados procedimentos de isolamento como descrito acima. Todo este procedimento é realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses.

Para a identificação molecular de leishmânia foram utilizados fragmentos de pele, fígado, baço e linfonodo dos hamsters inoculados, sendo 213 amostras humanas, coletadas nos anos de 2003 a 2005 e 10 amostras de cães, coletadas nos períodos de 2004 a 2006.

Todo o material foi enviado em tubos criogênicos imersos em tampão NET (NaCl 150mM, EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, pH 7,5) (CASTILHO *et al.*, 2003), mantidos a aproximadamente 4^oC até o processamento.

3.3 Técnicas Moleculares

3.3.1 Extração de DNA para identificação de Leishmânias

Para a detecção da infecção natural de flebotomíneos por leishmânias, o DNA foi extraído a partir de “pool” de insetos ou

individualmente, onde, após maceração, os mesmos passaram por ciclos de congelamento e descongelamento e incubação com proteinase K (PAIVA *et al.*, 2007).

Para as amostras de tecidos dos isolados, utilizamos o protocolo de extração clássica com lavagens de TE (10mM Tris- HCl, pH 8.0/ 1mM EDTA pH8.0) e fenol/clorofórmio. Para purificação de DNA, utilizamos o Kit QIAamp DNA extraction - Qiagen (PAIVA *et al.*, 2004).

3.3.2 Identificação do gênero e espécies de leishmânias em tecidos e em flebotomíneos

As linhagens de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75(M2682)), utilizadas como controle, são mantidas em nitrogênio líquido ou em cultivo em suspensão em meio M199.

As amostras foram amplificadas com *primers*, que tem como alvo seqüências de mini exon capazes de identificar as espécies de leishmânia (PAIVA *et al.*, 2006 e 2004). Nos casos em que os *primers* gênero específico (PG) resultaram fragmentos positivos para o subgênero *Viannia*, além da

amplificação com *primers* específicos para este subgênero (PV), enzimas *HaeIII* e *NcoI* (MARFURT *et al.* 2003) foram utilizadas para a diferenciar as espécies de leishmânias.

Segue abaixo as seqüências de *primers* utilizadas para as reações:

PG

LG1-(22 mer)tttattggtatgCGAAactcc

LG2-(25 mer)gaaactgatacttatatagcgtag

PV

LV1-(18 mer)CGTcttccggcaacattt

LV2-(20 mer)cgtagttggaagcccaagg

A reação foi realizada em volume final de 25 ul, utilizando-se os *primers* PG e PV, seguindo o seguinte protocolo: 5 ul de DNA, 0,2 ul Taq DNA polimerase (5 U/ul), 2,5 ul tampão 10x, 2 mM de MgCl₂, 2 ul dNTPmix (25 mM); 1 ul de cada primer (10 uM) e 2,5 % de formamida.

Condições de reação com PG: 95 °C por 5 minutos, para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 30 segundos, 73 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 6 minutos.

A reação com PV seguiu as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos, para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto 55 °C por 30 segundos, 73 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 6 minutos.

Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 1,8 % corado com brometo de etídeo (0,5 ug/ml), sob luz UV(ultravioleta). As amostras positivas com os *primers* PG resultaram em fragmentos de: 260 pb (*L.(L) amazonensis*); 230 (*L. (V) braziliensis* e *L.(V) guyanensis*), 360(*L.(L) chagasi*) e 410 pb para outros tripanossomatídeos (*Crithidia fasciculata* e *Endotrypanum shaudini*) (PAIVA *et al.*, 2006). As amostras positivas para o subgênero *Viannia* (PV) resultaram em fragmentos de 177 bp (PAIVA *et al.*, 2004).

Foram utilizados padrões de peso molecular de 100 pb e 50 pb (Invitrogen e Fermentas respectivamente) e controles positivos e negativos (amostras sem DNA ou sabidamente negativas) em todas as reações de PCR.

3.3.2.1 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) para diferenciação de leishmânias do subgênero *Viannia*

Foram digeridos 5 µl do produto de PCR (PG) com 1 U de *Hae III* e posteriormente outra reação foi realizada com 1U de *NcoI* (Amersham

Biosciences) por 1 hora a 37 °C. Após a dupla digestão, os fragmentos foram separados em gel de agarose 2.5 % ou gel de poliacrilamida 10 % corado com nitrato de prata.

3.4 Padronização da técnica de PCR para hábito alimentar

3.4.1 Repasto Sanguíneo

A fim de se padronizar a técnica de PCR para a detecção do hábito alimentar dos flebotomíneos, as seguintes amostras sanguíneas de animais foram utilizadas: humano (*Homo sapiens*), camundongo (*Mus musculus*), cão (*Canis familiares*), galinha (*Gallus domesticus*), cavalo (*Equus caballus*), gambá (*Didelphis marsupialis*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), porco (*Sus scrofa domestica*) e capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), cedidas por pesquisadores colaboradores (Adolfo Lutz, Butantã, FIOCRUZ, DEPAVE, SUCEN e IMT). Todas as amostras de sangue estavam conservadas em EDTA e mantidas a -20 °C. Utilizamos também DNA de flebotomíneo como controle negativo.

3.4.2 Vetores

Para a padronização da técnica foram utilizados as seguintes espécies ingurgitadas: 14 espécimes de *Nyssomyia intermedia*

provenientes de colônia, fornecidos pelo laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, 15 espécimes de *Aedes aegypti* de colônia cedidos pelo laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 5 espécimes de *Anopheles kerteszia cruzii* capturados em campo (Petar, Vale do Ribeira – SP, 2007) e 56 exemplares de *Lutzomyia longipalpis* de campo, capturados em Campo Grande (MS) em uma única armadilha instalada em um galinheiro. Todos os insetos chegaram identificados, imersos individualmente em isopropanol e mantidos a 4 °C.

3.4.3 Extração de DNA

A extração de DNA de sangue total foi realizada com Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega (Madison, USA).

A extração de DNA de sangue foi realizada a partir de um volume inicial de 300 µl, já para os flebotomíneos, 100 µl de cell lysis solution (solução 1) foi adicionado para cada tubo contendo um inseto seco. Este foi macerado e adicionado mais 800 µl da solução 1. A partir deste passo, seguiu-se as instruções do fabricante, sendo o DNA final hidratado em 20 µl de TE.

A extração de DNA que é realizada para identificação de leishmânia em insetos também foi testada para este fim.

3.4.4 Identificação de DNA das fontes de alimentação dos flebotomíneos

Para a identificação das fontes alimentares, utilizamos a metodologia descrita por Kirstein e Gray (1996). Os autores utilizaram a técnica de PCR-RFLP onde fragmentos do DNAm_t foram amplificados utilizando-se *primers* degenerados que tem como alvo regiões conservadas do gene *citocromo b* seguidos de digestão por várias enzimas de restrição.

Os *primers* utilizados foram:

cytb1 – (23 mer)ccatgaggacaaatattcattctg

cytb3 – (23 mer)gggtgttcd(g/a)actggy(c/t)tgb(g/t/c)ccy(c/t)cc

A reação com volume final de 25 µl foi composta por 1 U de Taq DNA polimerase, 2,5 µl de tampão 10X, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 1 µM de primer e 5 µl de DNA. A PCR foi realizada com desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C 2 minutos, 72 °C 1 minuto e meio e extensão final

de 72 °C por 5 minutos. O fragmento de 630 pb foi visualizado em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo sob luz UV.

Uma alíquota de 5 µl do produto de 630 pb foi digerida com 1.5 U de *HaeIII* e *DdeI* (Promega) por 1 hora a 37 °C, sendo o perfil visualizado em gel de agarose 2 %.

3.4.5 Clonagem e sequenciamento das fontes alimentares

Para confirmar os perfis de restrição o DNA amplificado das fontes alimentares foi clonado, seqüenciado e suas seqüências submetidas ao programa restriction mapper (<http://www.restrictionmapper.org/>) com as enzimas utilizadas na reação.

Nos procedimentos citados acima foram utilizados os Kits comerciais: para clonagem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen), extração de DNA de Plasmídeo GFX[™] Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) e sequenciamento Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização RFLP para subgênero *Viannia*

A procura de sítios de restrição existentes nos produtos amplificados do subgênero *Viannia* revelou que *L. (V.) braziliensis* possui sítio específico para enzima *HaeIII*, inexistente em *L. (V.) guyanensis*. A enzima *NcoI*, não diferencia as duas espécies, pois possuem o mesmo sítio de restrição (Figura 6).

A figura 6 mostra o perfil de restrição dos amplificados de 230 pb gerados a partir dos *primers* gênero específicos PG. Verifica-se que a enzima *HaeIII* mostra duas bandas, uma de 110 e outra de 120 pb aproximadamente, para *L.(V.)braziliensis*, já a enzima *NcoI* cortou as seqüências de *L.(V.)braziliensis* e *L.(V.)guyanensis* em duas posições iguais, gerando bandas de 175 e 55 pb (Tabela1). Sendo assim, a enzima *NcoI* foi descartada para experimentos posteriores.

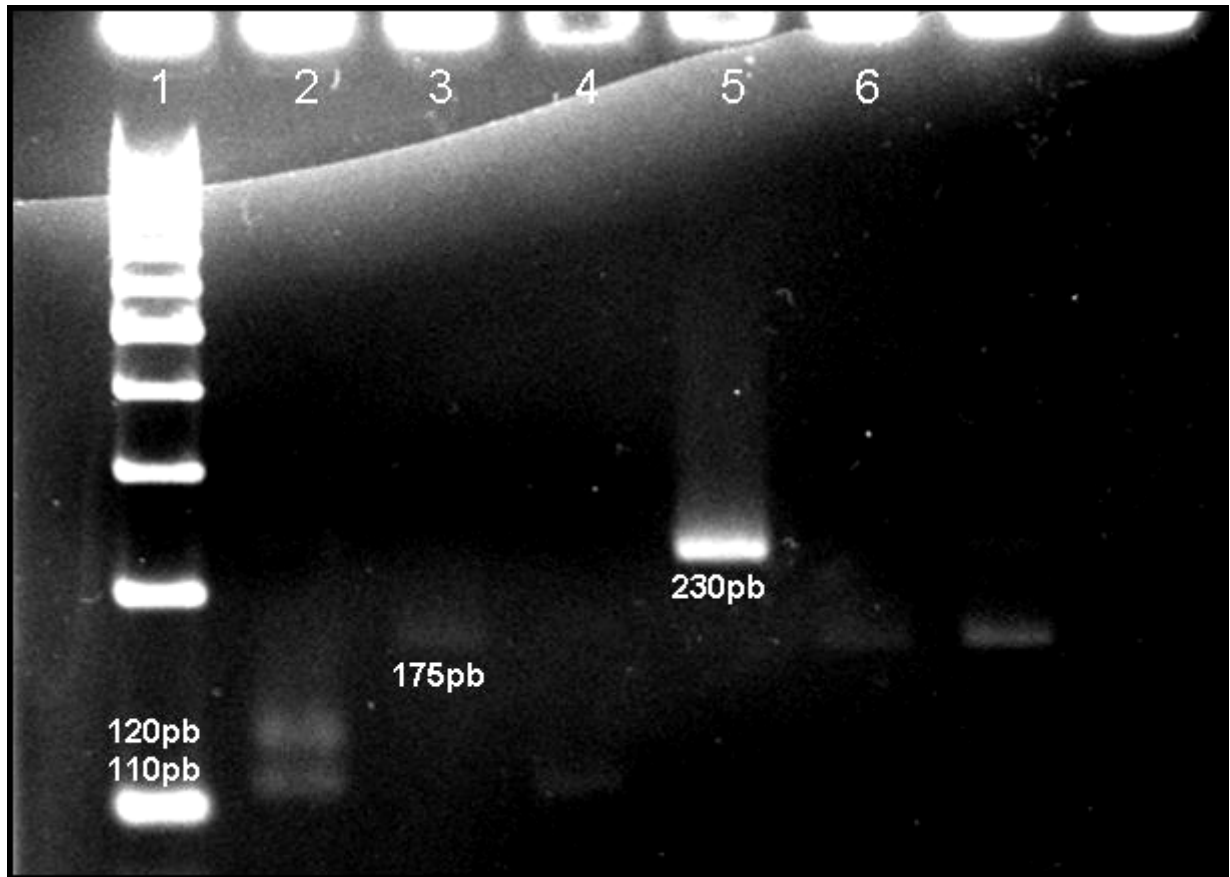


Figura 6: PCR-RFLP *Viannia*. Gel de agarose a 2,5%. 1- Pm 100pb, 2- *L.(V) braziliensis* + *HaeIII*, 3- *L.(V.) braziliensis* + *NcoI*, 5- *L.(V.) guyanensis* + *HaeIII*, 6- *L.(V.) guyanensis* + *NcoI*.

Tabela 1: Perfil de restrição PCR-RFLP mini-exon, para amplificados espécie específico PG.

	<i>HaeIII</i>	<i>NcoI</i>
<i>L.(V.)braziliensis</i> (230pb)	110 e 120pb	175 e 55pb
<i>L.(V.)guyanensis</i> (230pb)	Não corta	175 e 55pb

Os perfis de restrição gerados foram confirmados pelo programa restriction mapper (www.restrictionmapper.org).

4.2 Identificação de Leishmânias

4.2.1 Flebotomíneos capturados em Campo Grande

Na capital Campo Grande, durante todo o período de captura (entre 2003-2005) a taxa mínima de infecção (TM) detectada foi de 0,64%.

No período entre 12/2003 e 08/2004 em um total de 563 insetos processados a TM foi de 1,6% para todas as espécies e 0,94% somente para *Lu. longipalpis*, sendo que todos os espécimes estavam infectados por *L.(V.)braziliensis*. Os flebotomíneos positivos na PCR gênero específica (PG) apresentaram amplificação de 230 pb (Figura 7) e para subgênero *Viannia*

(PV) fragmento de 177pb (Figura 8). O RFLP com HaeIII gerou duas bandas de 110 e 120 pb (Figura 9).

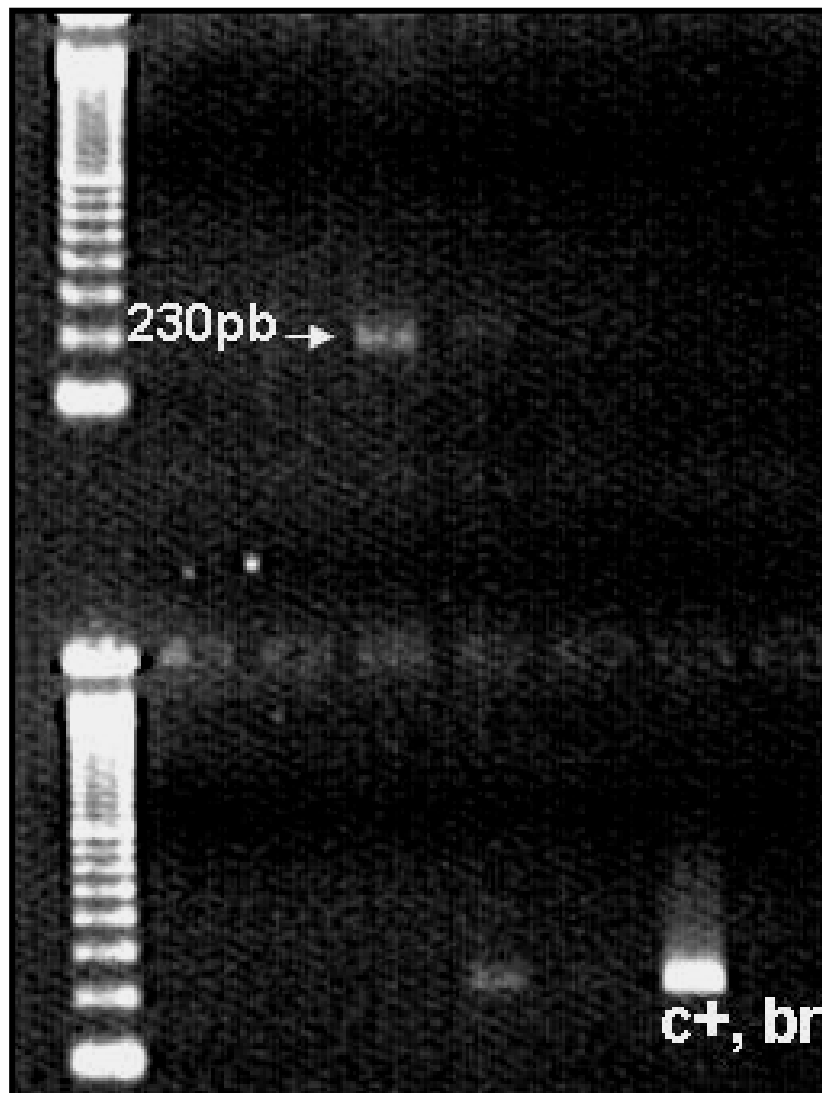
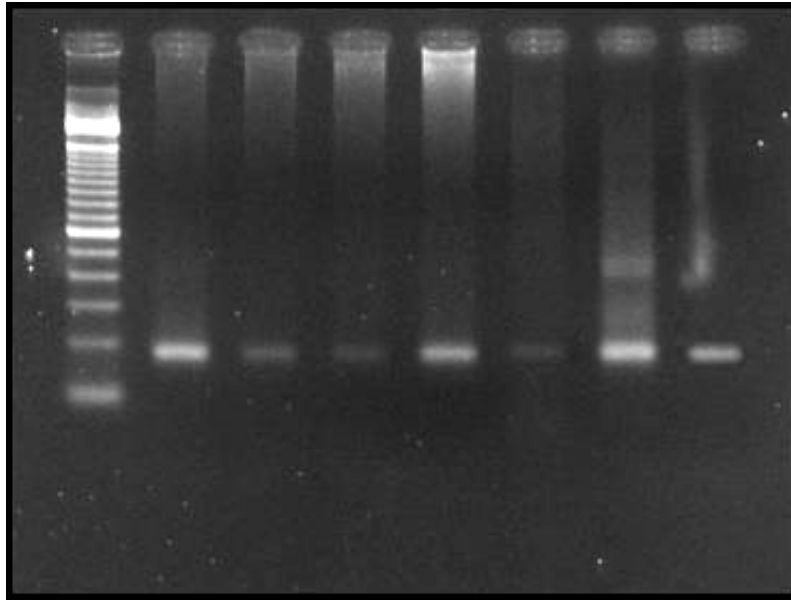
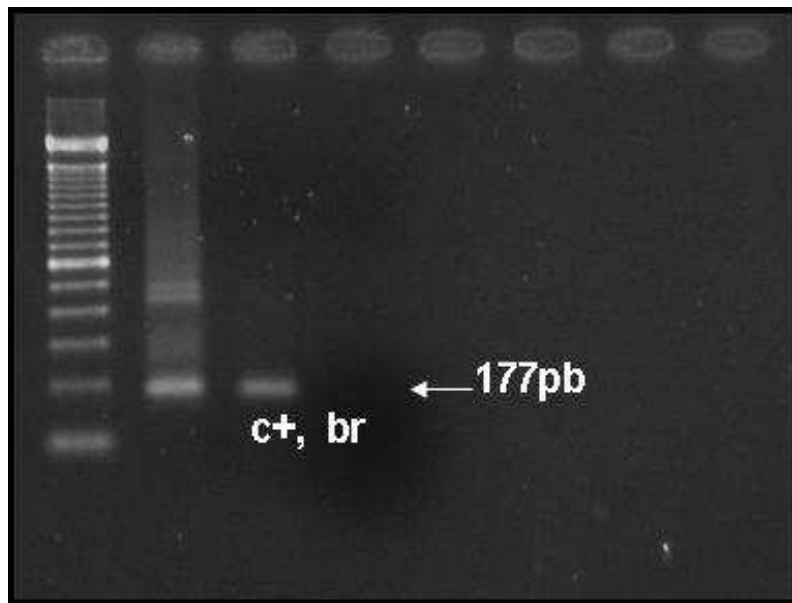


Figura 7: Perfil de amplificação PG dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 1^o período. Gel de agarose a 1,8%, Pm 100pb, c+ *L.(V.)braziliensis*.



A



B

Figura 8: Perfil de amplificação *Viannia* (PV) dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 1^o período (A e B). Gel de agarose a 1,8%, Pm 100pb, c+ *L.(V.)braziliensis*.

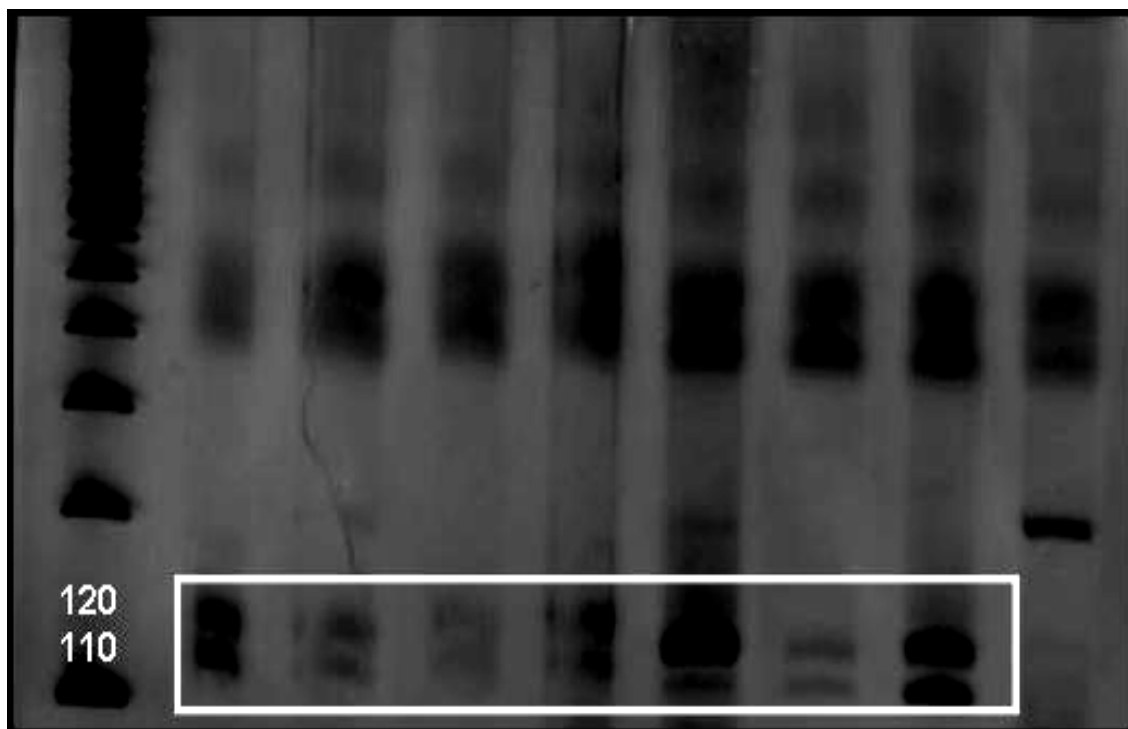


Figura 9: PCR-RFLP flebotomíneos de Campo Grande-MS do 1º período. Gel de poliacrilamida a 10%, 1-Pm 100pb, 2-8 flebotomíneos positivos para *Viannia* e 9- controle sem digestão com *HaeIII*.

Do total de 2.075 flebotomíneos testados entre o período de 09/2004 e 11/2005, todos resultaram positivos para *L.(L.) amazonensis*. A TM foi de 0,38% para todas as espécies testadas, sendo que para *Lu. longipalpis* está foi de 0,29%. Os positivos para PG apresentaram ampliações de 260pb (Figura 10) e negativos para PV.

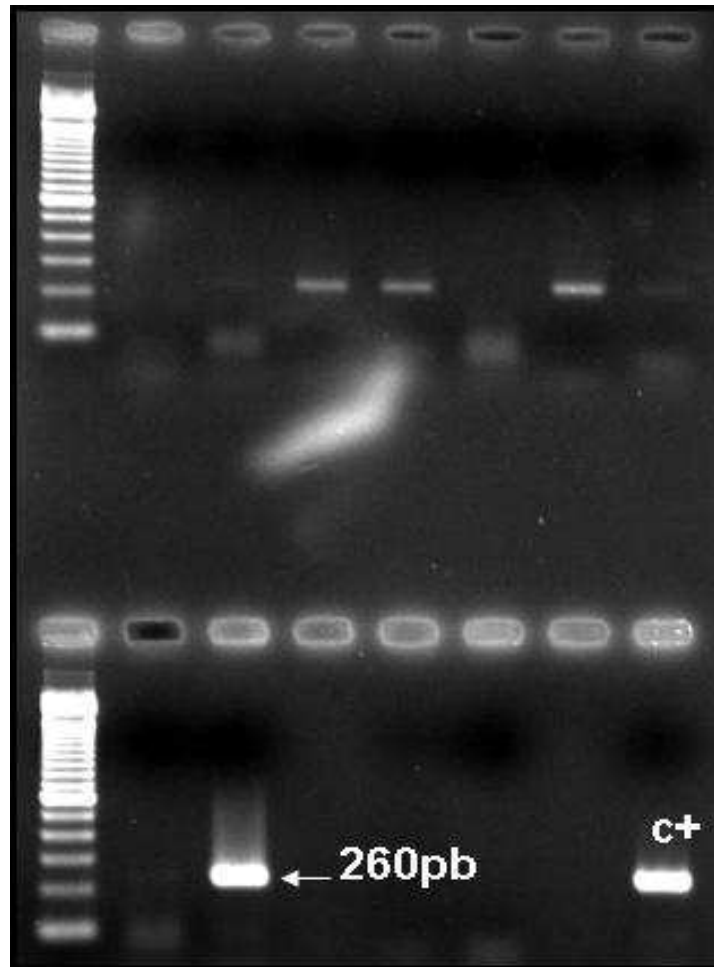


Figura 10: Perfil de amplificação PG dos flebotomíneos de Campo Grande (MS) do 2º período. Gel de agarose a 1,8%, Pm 100pb e c+ *L.(V.) braziliensis*.

Os flebotomíneos infectados por *L. (V.) braziliensis* foram capturados nas regiões Sul e Oeste e os infectados por *L.(L.) amazonensis* procederam da região Oeste da Capital, sendo capturados nos seguintes habitats: intradomicílio, peridomicílio e mata (Figura 11 e Tabela 2).

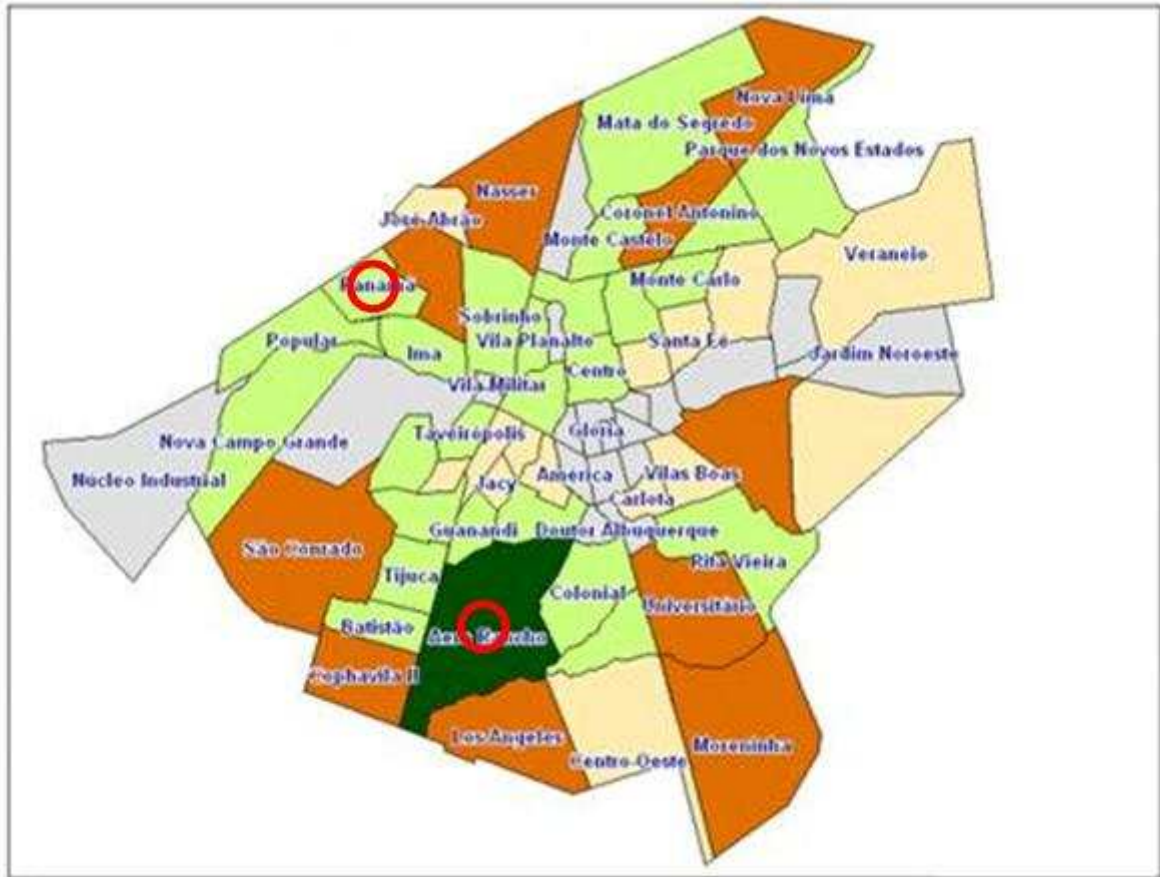


Figura 11: Mapa de Campo Grande com as localizações dos flebotomíneos infectados.

Observa-se que houve um intervalo de 6 meses entre as capturas dos flebotomíneos infectados por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*.

Foram processados 234 flebotomíneos individualmente e 314 em “pools” de 2 a 10 insetos, sendo que nos foram enviados 830 insetos no primeiro ano e 1.245 no segundo ano. Dentre os *pools* positivos a metade possuía 1 inseto por tubo.

Tabela 2: Espécies de flebotomíneos infectados provenientes de Campo Grande, durante o primeiro e segundo período de captura.

2003-2004(“pools”)	2004-2005(“pools”)
<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>L.(L.) amazonensis</i>
*# <i>Lu.longipalpis</i> (4), intra e peri	*# <i>Lu.longipalpis</i> (5), intra e mata
* <i>Ny. whitmani</i> (1), peri	# <i>M. quinquefer</i> (1), mata
* <i>Ev. lenti</i> (1), peri	# <i>Pi.christenseni</i> (2), peri
* <i>Ps. clauserei</i> (1), mata	
# <i>Ps. aragaoi</i> (1), mata	
* <i>M. quinquefer</i> (1), mata	
Total: 9 positivos	Total: 8 positivos

*individual, # *pool*

4.2.2 Isolados de casos humanos de Campo Grande e outros municípios

Dos 213 casos que se tentaram isolar em animais 5 foram identificados como *L.(V.) braziliensis*, demonstrando ampliações para PG (Figura 12), PV (Figura 13) e digestão com *HaeIII* (Figura 14).

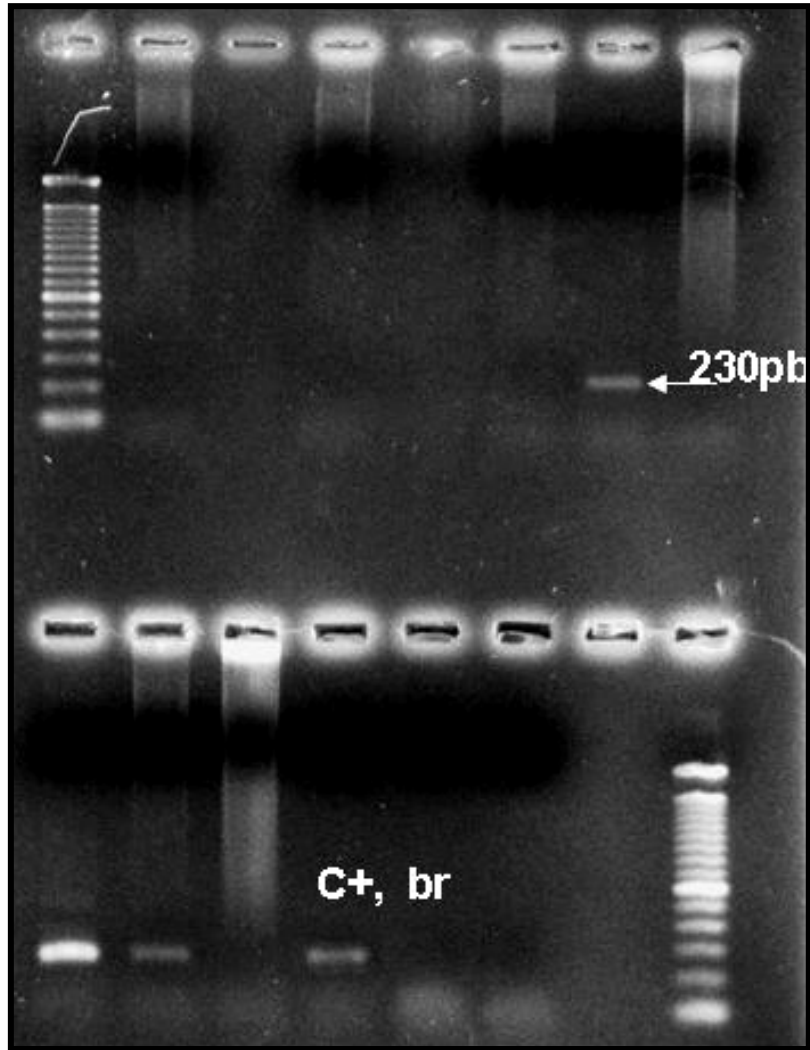


Figura 12: Perfil de amplificação PG das amostras humanas. Gel de agarose a 1,8% agarose, Pm 100pb e c+ *L.(V.)guyanensis*.

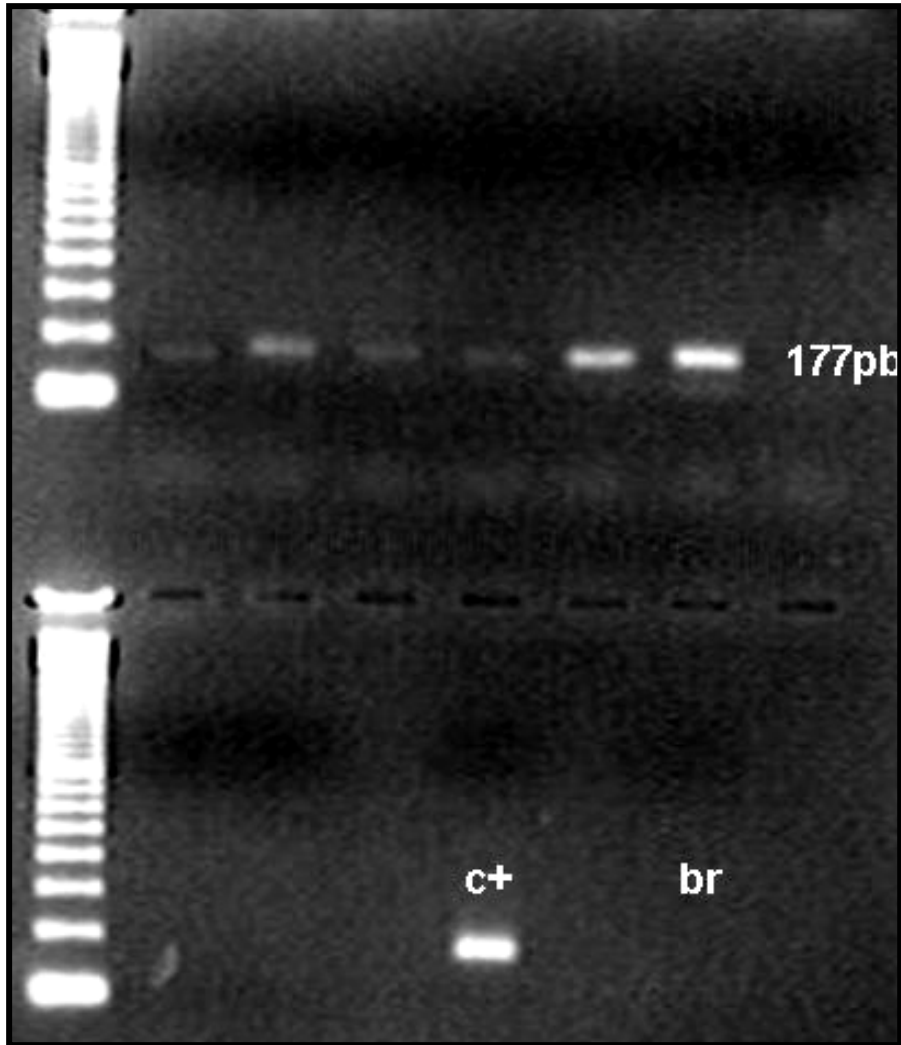


Figura 13: Perfil de amplificação PV das amostras humanas. Gel de agarose a 1,8%, 1-Pm 100pb, 2-7 amostras positivas, 9-Pm 100pb, 13-c+ *L.(V.)guyanensis*, 15-br.

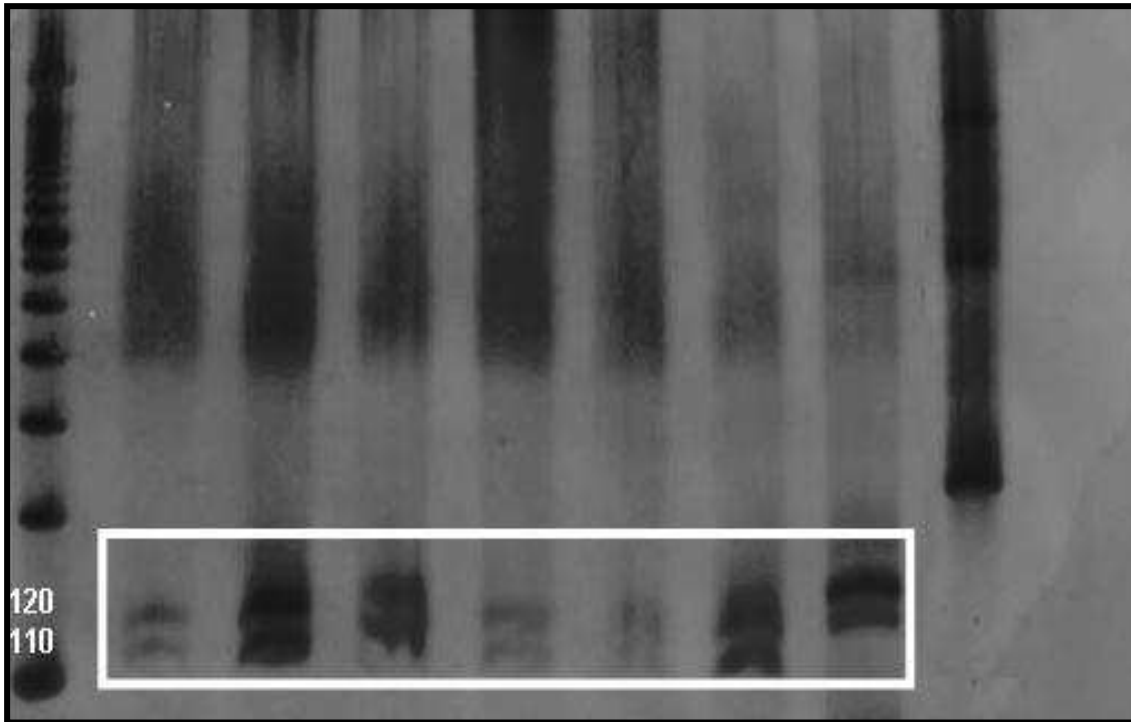


Figura 14: PCR-RFLP amostras humanas. Gel de poliacrilamida a 10%, 1-Pm 100pb, 2-8 amostras positivas para *Viannia* e 9- controle sem digestão com *HaeIII*.

Dos 5 positivos 2 eram provieram de Campo Grande, e os restantes de Corguinho (70 km da capital), Dois Irmãos de Buriti (72 km) e Água Clara (184 km) (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos isolados humanos identificados como positivos para *L.(V.) braziliensis*, segundo procedência e ano de coleta.

Descrição paciente, forma clínica e material analisado (Hamster).	Procedência e ano
Pediátrico, masculino. Forma clínica: L V. Material: baço	Campo Grande, 2004
Pediátrico, feminino. Forma clínica: L V. Material: fígado	Campo Grande, 2005
22 anos, feminino. Forma clínica: L T. Material: pele, baço e linfonodo	Corguinho, 2003
72 anos, masculino. Forma clínica: L T. Material: pele	Dois Irmãos de Buriti, 2003
48 anos, masculino. Forma clínica: L T. Material: pele	Água Clara, 2004

* LV-Leishmaniose Visceral, LT- Leishmaniose Tegumentar.

4.2.3 Flebotomíneos capturados em Bela Vista

Dos 825 flebotomíneos capturados na mata durante o período de 2004 a 2006, a taxa mínima de infecção por *L.(L.) amazonensis* foi de 0,6% para todas espécies e 0.2% somente para *Bi. flaviscutelata*. Para outros tripanossomatídeos a TM foi de 0,24% (Figura 15), sendo encontradas infectadas *Bi. flaviscutelata*, *Ny. whitmani* entre outros (Tabela 4). Nenhum flebotomíneo foi encontrado infectado por leishmânias do subgênero *Viannia* (PV).

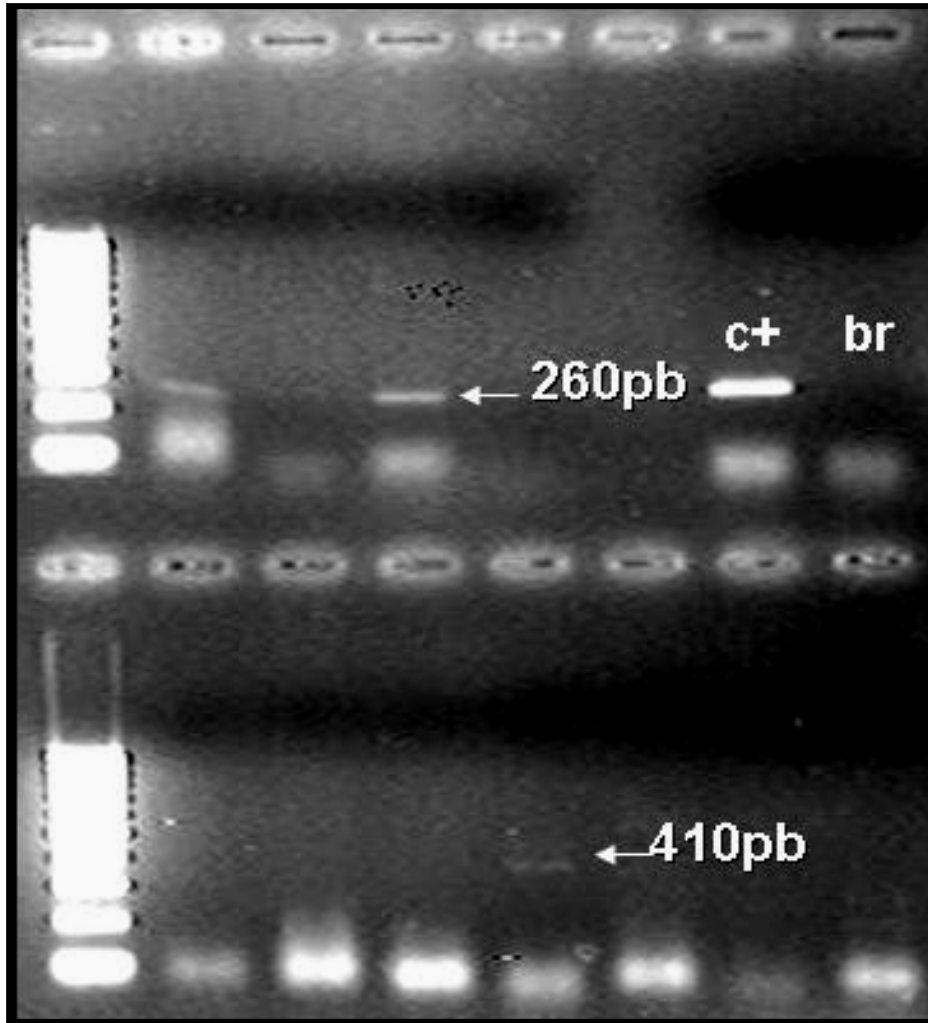


Figura 15: Perfil de amplificação PG flebotomíneos Bela Vista (MS). Gel de agarose a 1,8% agarose, 1-Pm 100pb, 2-6 flebotomíneos, 7-*L.(L.)amazonensis*, 8-br, 9-Pm 100pb, 10-16 flebotomíneos (13 flebotomíneos positivo para outros tripanossomatídeos).

Foram processados 61 flebotomíneos individualmente, sendo que destes, 3 foram positivos. Outros 129 foram dispostos em “pools” de 2 a 10 insetos, dentre estes 2 foram positivos (Tabela 4).

Tabela 4: Flebotomíneos infectados capturados em Bela Vista.

“Pools” infectados por <i>L (L.) amazonensis</i>	“Pools” infectados por <i>Crithidia sp.</i> ou <i>Endotrypanum sp.</i>
<i>Bi. flaviscutelata</i> (1)	<i>Ps. shannoni</i> (1)
* <i>Ny. whitmani</i> (1)	* <i>Brumptomyia sp.</i> (1)
* <i>Sc. sordelli</i> (1)	
* <i>Ps. punchgeniculata</i> (1)	
<i>Br. brumpti</i> (1)	
Total de positivos: 5	Total de Positivos: 2

*individual

4.2.4 Isolados de cães de Bela Vista

De um total de 10 amostras isoladas, 2 amostras foram identificados para *L.(L.) amazonensis*, sendo positivos para PG (Figura 16) e negativos para PV.

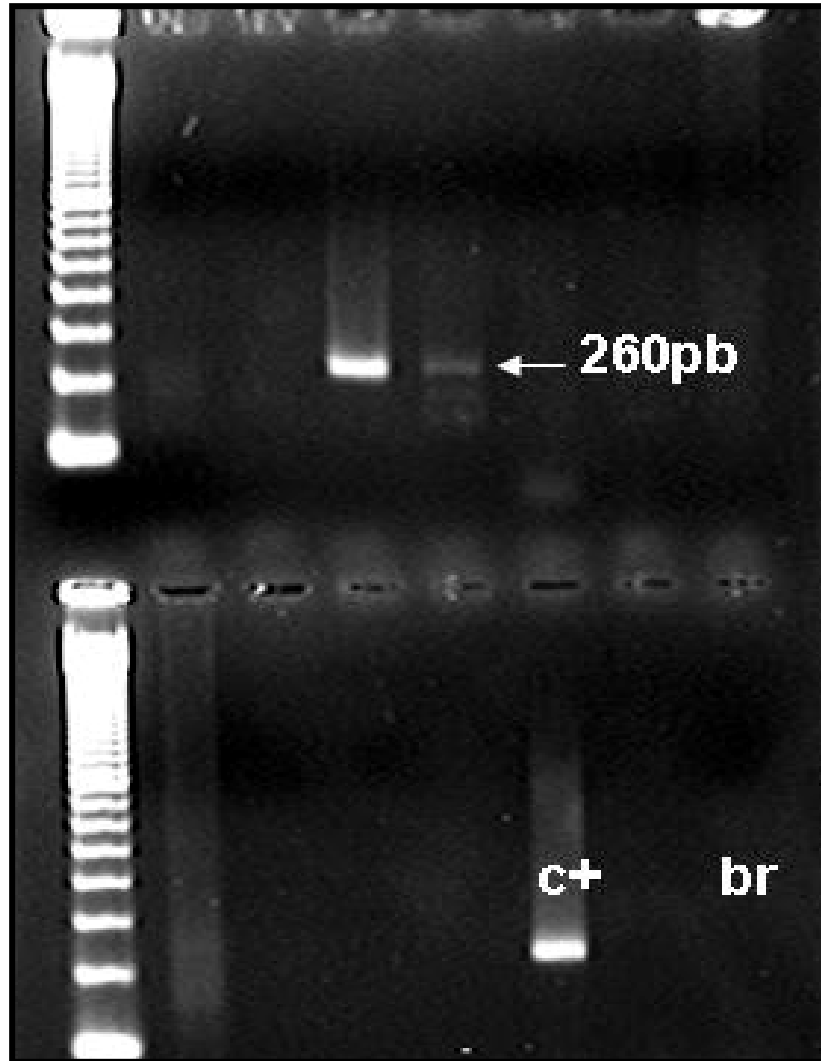


Figura 16: Perfil de amplificação PG dos isolados de cães de Bela Vista (MS). Gel de agarose a 1,8%, 1-Pm 100pb, 2-8 amostras de cães, 9-Pm 100pb, 10-12 amostras de cães, 14-c+ *L.(V.)braziliensis*, 16- br.

Os órgãos coletados para análise dos 10 hamsters foram: baço, fígado e linfonodo, sendo que nos 2 positivos o material do órgão que apresentou amplificação foram baço e linfonodo respectivamente. Segundo os veterinários, alguns cães apresentaram a forma visceral da doença.

4.3 Padronização hábito alimentar:

4.3.1 Fontes alimentares

A PCR para identificação de hábito alimentar, a partir de citocromo b, foi capaz de amplificar banda de 630 pb e identificar por RFLP 9 fontes alimentares, sendo elas de humano, galinha, camundongo, cavalo, gambá, capivara, porco, cachorro doméstico e cachorro do mato (Figura 17, 18, 19 e Tabela 5). Os amplificados foram clonados, seqüenciados (anexo) e confirmaram seus perfis de restrição (restriction mapper). Bandas geradas abaixo de 100 pb foram descartadas da diferenciação e as consideradas para diferenciação estão com valores aproximados.

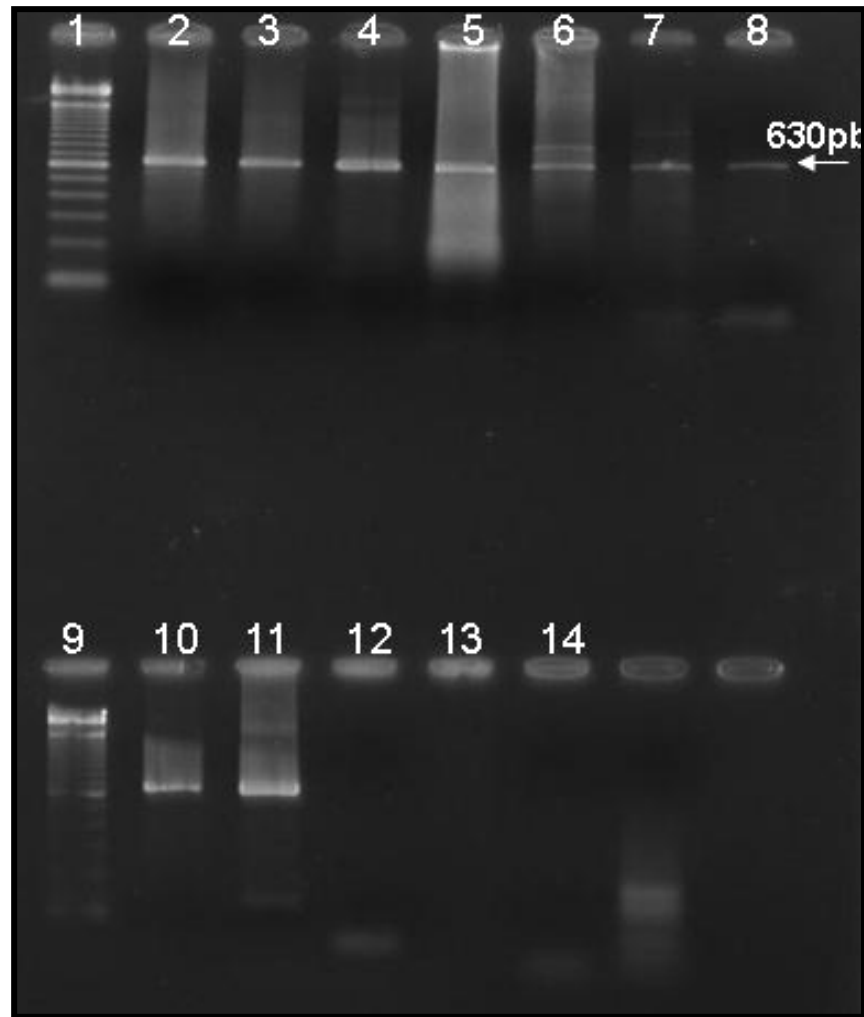


Figura 17: Perfil de amplificação PCR habito alimentar. Gel de agarose a 1,5%.
 1- Pm 100pb, 2- humano, 3- porco, 4- camundongo, 5- galinha, 6- cavalo, 7- cachorro do mato, 8- gambá, 10- capivara, 11- cão, 12- flebotomíneo ã ingurgitado, 14- branco.

Para se identificar as diversas fontes alimentares, os amplificados de 630 pb foram cortados com as enzimas de restrição *HaeIII* (Figura 18) e *DdeI* (figura 19).

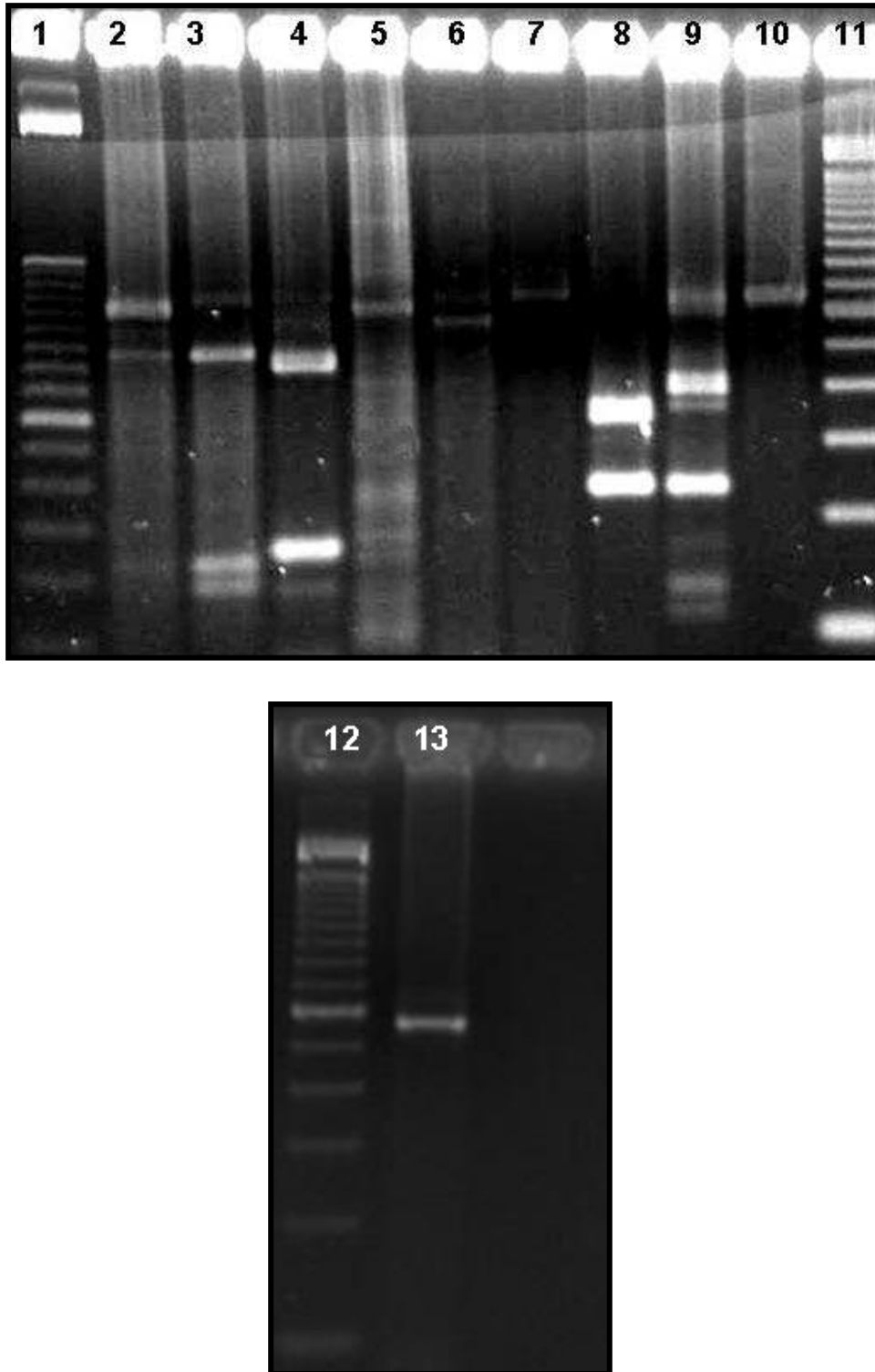


Figura 18: RFLP *HaeIII* fontes alimentares. Gel de agarose a 2%. 1- Pm 50pb, 2- humano, 3- porco, 4- camundongo, 5- galinha, 6- cavalo, 7- cachorro do mato, 8- gambá, 9- capivara, 10- controle s/ *HaeIII*, 11 e 12- Pm 100pb, 13- cão.

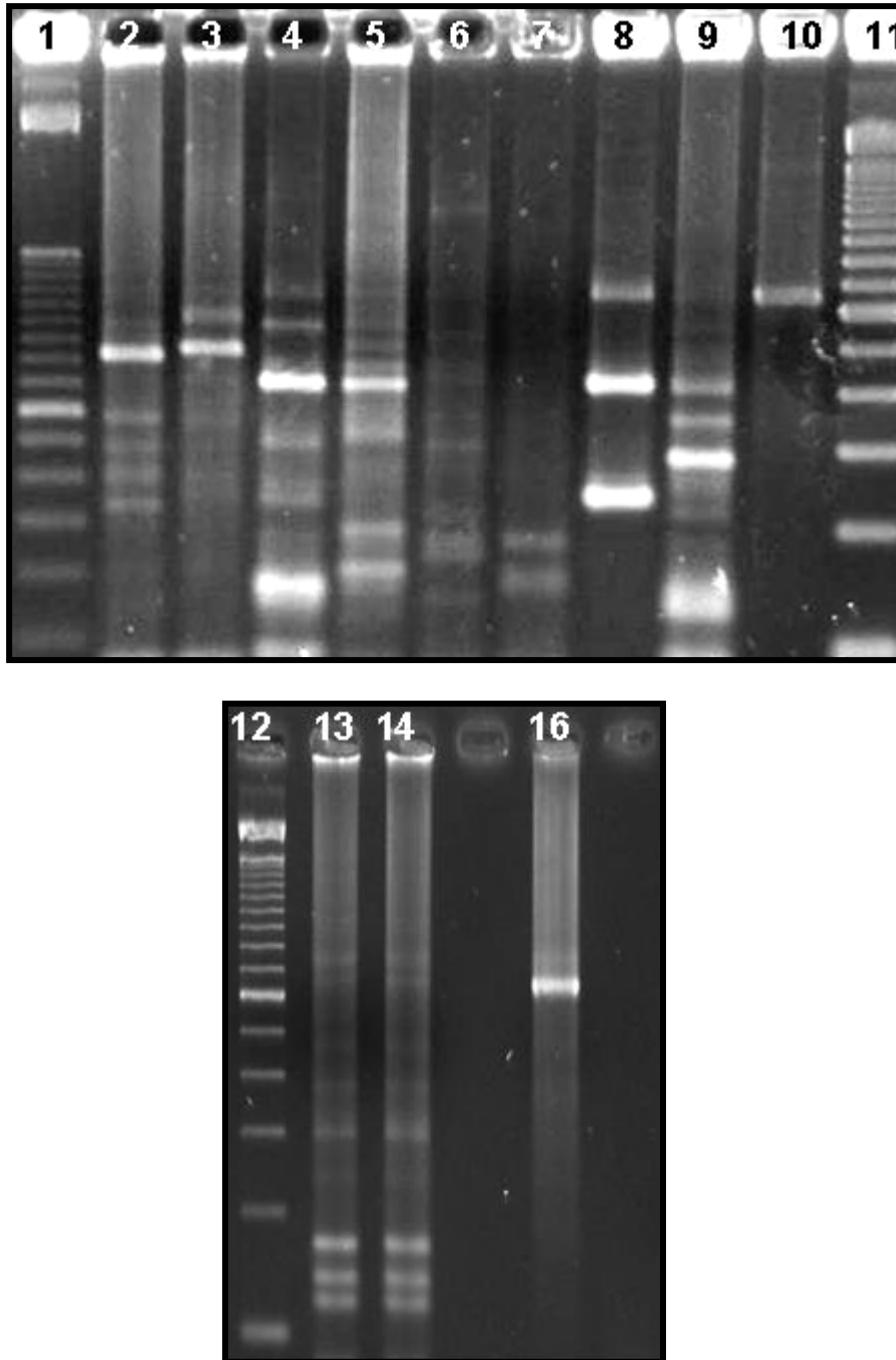


Figura 19: RFLP *DdeI* fontes alimentares. Gel de agarose a 2%. 1- Pm 50pb, 2- humano, 3- porco, 4- camundongo, 5- galinha, 6- cavalo, 7- cachorro do mato, 8- gambá, 9- capivara, 10- controle s/ *DdeI*, 11 e 12- Pm 100pb, 13 e 14- cão, 16- controle s/ *DdeI*.

A identificação da fonte alimentar é dada pelo tamanho dos fragmentos gerados pelos cortes com as enzima de restrição (Tabela 5).

Tabela 5: Padrão RFLP das fontes alimentares

Fontes alimentares	<i>Hae III</i>	<i>DdeI</i>
Humano	600pb	450pb
Porco	140, 500pb	460pb
Camundongo	180, 450pb	150, 400pb
Galinha	600pb	150, 400pb
Cavalo	550pb	120, 160, 170pb
Cachorro do mato	ñ corta	140, 150, 180pb
Gambá	240, 350pb	230, 400pb
Capivara	240, 400pb	130, 280pb
Cão	580pb	120, 140, 170pb

4.3.2 Validação da técnica em insetos

Para a padronização da PCR foram utilizados flebotomíneos e *Aedes aegypti* de colônia alimentados no 1º dia e *Anopheles kerteszia cruzii*

capturadas em campo, sendo avaliado o modo de conservação e extração de DNA.

O método de conservação com isopropanol, como é feito para identificação de leishmânia, apresentou bons resultados, já a extração de DNA mais prática e que gerou melhores ampliações foi o método de extração de sangue com o Kit da promega (Figura 20). Os *Anopheles kerteszia cruzii* de campo não apresentaram amplificação em nenhum dos testes.

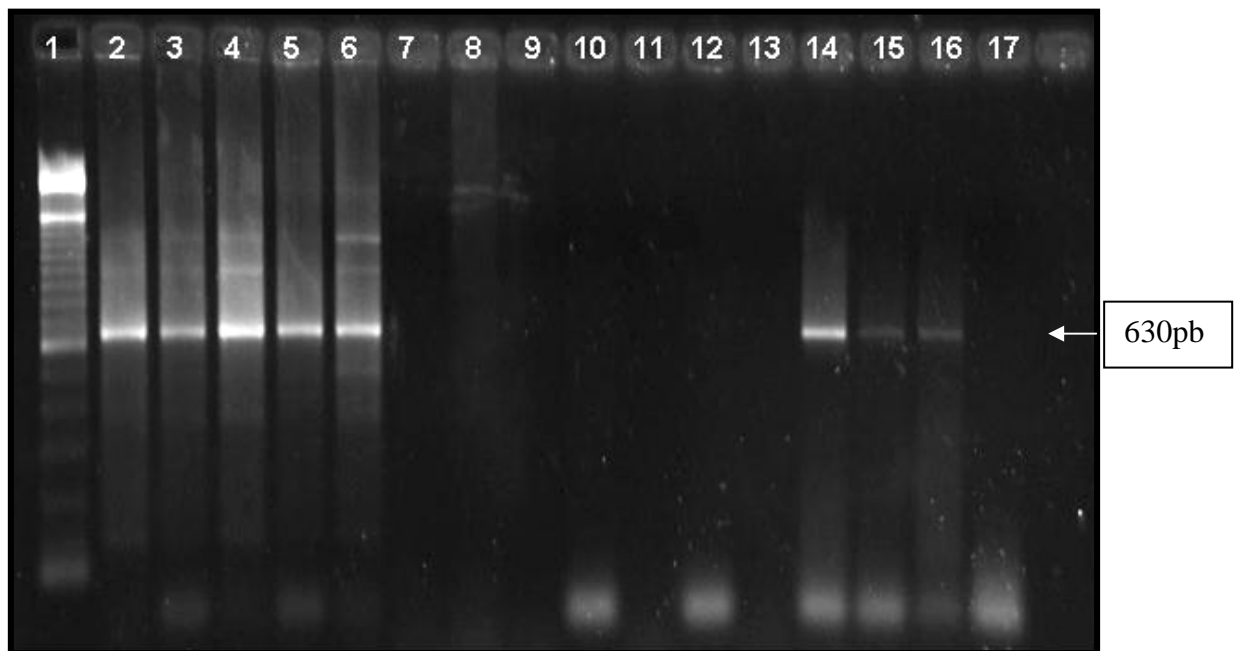


Figura 20: Padronização PCR Hábito alimentar de insetos. Gel 1,5% agarose. 1- Pm 100pb, 2-6 *Aedes aegypti* de colônia, 7-11 *Anopheles kerteszia cruzii* de campo, 12-16 *Ny. intermedia* de colônia, 17- branco.

4.3.3 Flebotomíneos capturados em campo

Ao final da padronização, foi possível identificar alimentação de galinha em 68% de insetos capturados em Campo Grande (MS). Após amplificação (Figura 21) e RFLP, os perfis gerados de 600 pb para digestão com *HaeIII* (Figura 22) e de 150 e 400 pb para digestão com *DdeI* (Figura 23) foram comparados com as 9 fontes já conhecidas, sendo compatível com o perfil de galinha.

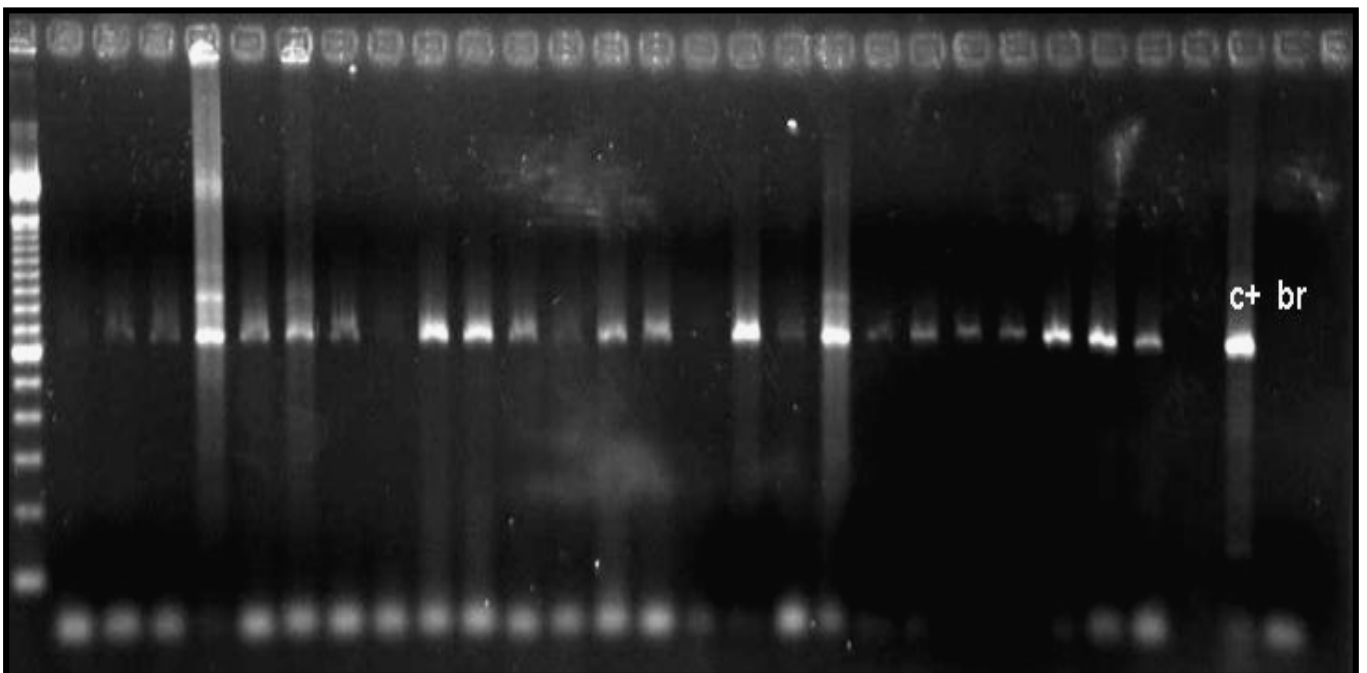


Figura 21: Perfil de amplificação hábito alimentar flebotomíneos de campo. Gel de agarose a 1,5%, 1-Pm 100pb, 2-26 flebotomíneos de campo, 28-c+ inseto de colônia ingurgitado, 29-br .

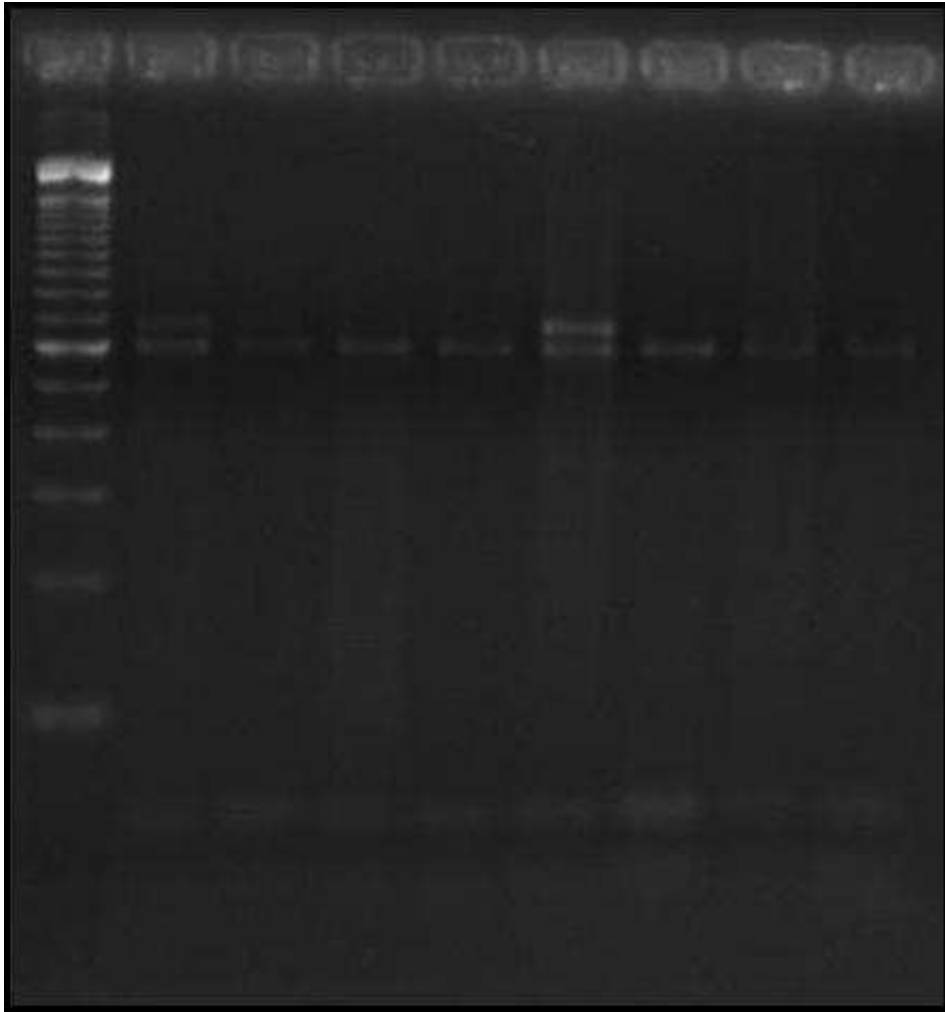


Figura 22: RFLP *HaeIII* Hábito alimentar flebotomíneos de campo. Gel de agarose a 2%, 1-Pm 100pb, 2-9 flebotomíneos de campo.

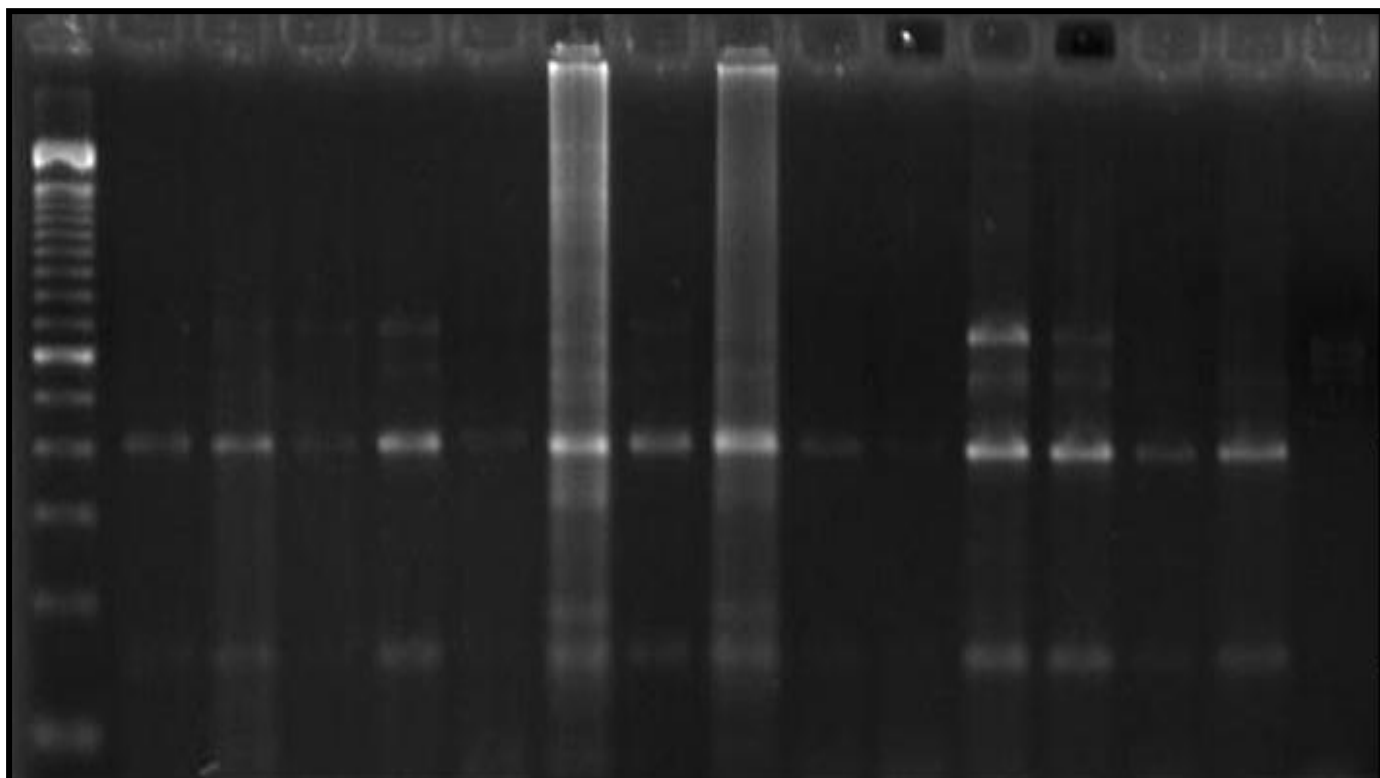


Figura 23: RFLP *DdeI* Hábito alimentar flebotomíneos de campo. Gel de agarose a 2%, 1-Pm 100pb, 2-17 flebotomíneos de campo.

5 DISCUSSÃO

A correta identificação das espécies de flebotomíneos reconhecendo os possíveis vetores, o conhecimento de seus hábitos alimentares bem como a identificação da espécie de leishmânias que acometem seus hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma área endêmica de Leishmaniose, são fundamentais para a compreensão da epidemiologia da doença, auxiliando na adoção de medidas de prevenção e controle da desta parasitose (MICHALSKY *et al.*, 2002).

A leishmaniose no Estado de Mato Grosso do Sul, como em outras áreas brasileiras, encontra-se em processo de expansão geográfica. Nos últimos anos, o Estado sofreu várias modificações ambientais como: construção de gasodutos, destruição de áreas de cerrado, movimentos de grupos ligados a projetos agropecuários, industrialização e turismo (SILVA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2008) e como consequência destas modificações ocorreu a dispersão e a adaptação de reservatórios naturais do parasito e seus vetores em ambientes antrópicos (LAINSON e SHAW, 2005).

Em nossos estudos, identificamos infecção espécie específica por leishmânia em flebotomíneos e mamíferos como também padronizamos técnica para identificação de hábito alimentar destes insetos no Estado do Mato Grosso do Sul.

As PCRs que identificaram leishmânias gênero específico (PG) e subgênero *Viannia* específico (PV) separaram as pertencentes aos três Complexos (*mexicana amazonensis*, *braziliensis* e *donovani*), mas não distingue as espécies pertencentes ao mesmo complexo. Para tal foi padronizada uma PCR-RFLP capaz de diferenciar as duas espécies de leishmânia do complexo *braziliensis* mais freqüentes no Brasil (*L.(V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis*).

Foram utilizadas duas enzimas de restrição *HaeIII* e *NcoI*, selecionadas com base no protocolo descrito por Marfurt *et al.* (2003). A digestão dos produtos amplificados pelos *primers* PG para as duas espécies revelou que *L.(V.) braziliensis* possui sítio específico para a enzima *HaeIII*, o que não ocorre com a *L.(V.) guyanensis*; já a enzima *NcoI*, não diferencia as duas espécies, pois possuem o mesmo sítio de restrição. Estes perfis foram confirmados pela submissão das seqüências obtidas destas amplificações juntamente com as enzimas ao programa restriction mapper.

Os diferentes padrões de bandas resultantes da digestão variam de acordo com: mutações nas seqüências de reconhecimento da enzima de restrição escolhida, número dos fragmentos gerados e na variação de tamanho da região intergênica do mini exon, podendo uma mesma espécie, de cepas diferentes, produzirem perfis distintos (MARFURT *et al.*, 2003).

Taxas de infecção por flagelados em flebotomíneos com o uso da metodologia convencional (dissecção) no Brasil variam de 0,06% a 0,8% e são consideradas baixas e menos específicas quando comparadas a outros estudos onde foram realizadas tanto a identificação convencional como a molecular (PAIVA *et al.*, 2006).

Um estudo realizado na Venezuela, detectou infecção por flagelados em 2,2 % dos flebotomíneos capturados em campo, enquanto que o PCR demonstrou taxa de infecção de 7,7% para *L. (V.) braziliensis* (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). No Peru à presença de flagelados foi detectada em 0,49% das *Lu. ayacuchensis* e 1,42% das *Lu. noguchii*, no entanto, o PCR identificou *Leishmania (Viannia)* na maioria destas *Lu. ayacuchensis*, demonstrando assim que esta espécie é a única envolvida na transmissão da doença nesta área (CACERES *et al.*, 2004).

No presente estudo, a sensibilidade da técnica de PCR foi confirmada ao analisar-se flebotomíneos capturados em campo provenientes de duas regiões: Campo Grande, período de 2003-2005 e município de Bela Vista, período de 2004-2006. Verificamos que a taxa mínima de infecção por leishmânias foi de 0,6% para ambas as áreas. Quando estes mesmos insetos de Bela Vista foram dissecados esta taxa foi de apenas 0,1% (DORVAL, 2006).

No mesmo estado, com períodos de captura de insetos mais curtas, foram detectadas taxas de infecção por PCR e dissecação de 3,7 % e 1,24 % respectivamente em Dourados (PAIVA *et al.*, 2006), 1 % (PITA - PEREIRA *et al.*, 2008) e 0,39% (DOS SANTOS *et al.*, 1998) em Corumbá e 1,23 % e 0,22% em Bonito (SAVANI *et al.*, 2009). Somente por PCR foram detectadas taxas de 1,9 % em Campo Grande (Silva *et al.*, 2008).

Verificamos, em Campo Grande, que espécies diferentes de leishmânias foram identificadas nos flebotomíneos capturados em anos diferentes. A espécie identificada entre o período de 12/2003 e 08/2004 foi *L.(V.)braziliensis* exibindo taxa mínima (TM) de infecção de 1,6% enquanto que entre 09/2004 a 11/2005, os insetos apresentaram infecção por *L.(L.) amazonensis* com TM de 0,38%. O número de insetos capturados nos dois períodos foi diferente sendo de 563 e 2.075 respectivamente, com predomínio de *Lu. longipalpis* em ambos os períodos.

A LT é endêmica no Mato Grosso do Sul, atingindo praticamente todos os seus 78 municípios, Campo Grande é a quarta cidade do estado com maior incidência, apresentando 15 novos casos em 2006 (SINAN/SVS/MS, 2008). *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) amazonensis* e *L.(L.) chagasi* já foram identificadas no Estado (NUNES, 2001, NUNES *et al.*, 1995, DORVAL *et al.*, 2006). Em Campo Grande já foram identificados

animais com Leishmaniose Tegumentar associados à infecção por *L.(L.) amazonensis* (SOUZA *et al.*, 2005).

No município de Campo Grande, Oliveira *et al.* (2003) relataram à ocorrência de três espécies incriminadas como vetoras de LT, *Ny. whitmani*, *Bichromomyia flaviscutelata* e *Migonemyia migonei*, capturadas em área urbana.

Foram identificadas infectadas por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*, *Lu. longipalpis* vetora reconhecida de *L.(L.) infantum chagasi* e infectada por *L.(V.) braziliensis*, *Ny. whitmani* vetora reconhecida de *L.(V.) braziliensis*. Outros flebotomíneos que não são reconhecidos, até o momento, na transmissão da Leishmaniose, também demonstraram infecção. Estes foram encontrados infectados por terem se alimentado em hospedeiros infectados, mas não participando da transmissão da doença propriamente dita.

De acordo com Oliveira *et al.* (2006) *Ny. whitmani* é a terceira espécie mais abundantes na capital e encontra-se bastante adaptada tanto em ambientes silvestres quanto aos antrópicos.

Lu. longipalpis foi encontrada infectada por ambas espécies, resultados semelhantes também foram relatados por Paiva *et al.*(2006) e Savani *et al.* (2009) no Estado do Mato Grosso do Sul.

A capacidade deste flebotomíneo de se infectar por estas espécies foi demonstrada por Silva *et al.*, 1990 e a capacidade de transmitir *L. (L.) amazonensis* foi obtida por meio de repasto sanguíneo em hamster (SHERLOCK, 1996).

Apesar das interações entre parasita e vetor serem espécie específica, a *Lu. longipalpis* é considerada um vetor permissivo, pelo fato da LPG (proteína de superfície lipofosfoglicana) das formas promastigotas não precisarem se aderir ao epitélio intestinal para se desenvolverem no vetor (VOLF E MYSKOVA, 2007). Em áreas onde *Bi. flaviscutelata* está ausente, ou onde ambas vivam em simpatria, *Lu. longipalpis* pode substituir esta espécie e ser considerada vetor de *L. (L.) amazonensis* (SAVANI *et al.*, 2009).

O encontro de *Lu. longipalpis* infectada por estas espécies no intra e peridomicílio apresenta informação adicional no entendimento da epidemiologia da doença nesta região.

Algumas armadilhas são mais indicadas do que outras para a captura de determinadas espécies de insetos, verificamos que durante todo o período de captura em Campo Grande, foram capturados apenas dois exemplares de *Bi. flaviscutelata* na região Oeste. Este fato foi

atribuído ao uso de armadilhas luminosas que não são as mais indicadas para captura destas espécies (OLIVEIRA, 2006).

Entre os flebotomíneos encontrados infectados por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* observa-se que houve um intervalo de 6 meses, correspondentes aos meses mais frios do ano (abril-agosto), onde, de acordo com estudos de sazonalidade, são épocas em que se verifica redução da quantidade de insetos capturados (OLIVEIRA *et al.*, 2008a).

Enquanto na região Sul da capital os flebotomíneos foram identificados infectados por *L. (V.) braziliensis*, na região Oeste estes foram identificados infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*.

A região sul é composta por chácaras com mata residual, casas de alvenaria, árvores frutíferas, canil e galinheiro, já a região Oeste é um bairro recém criado por um programa de desfavelamento da prefeitura (OLIVEIRA *et al.*, 2008a). A Capital, como todo o Estado, sofreu mudanças ambientais e estas criaram condições favoráveis à dispersão tanto dos vetores como dos hospedeiros.

A expansão e a prevalência crescente de Leishmaniose em áreas urbanas vêm ocorrendo devido a migrações humanas e transporte de cães infectados de regiões endêmicas para áreas urbanas empobrecidas onde a *Lu. longipalpis* já existe. Embora, geralmente localizadas às margens das

grandes cidades brasileiras, estas áreas de ocupação (favelas) estão se espalhado ao longo da zona urbana (LAINSON, 1989).

Apesar do número de flebotomíneos utilizados para identificação de leishmânia não representarem o número total de insetos capturados em Campo Grande, pois alguns exemplares foram utilizados para outros estudos, foi observado um maior rendimento nas coletas do segundo período, este fato foi atribuído a fortes chuvas nos 4 meses (10/04 – 01/05). Outros fatores não sofreram variações significativas. Como a maioria dos insetos, os flebotomíneos apresentam grandes picos após períodos com elevados índices pluviométricos (OLIVEIRA, 2006).

Das amostras humanas de Campo Grande e outros municípios provenientes de isolamento em hamster, 5 foram identificadas como *L.(V.) braziliensis*, sendo 2 de Campo Grande, e os restantes de Corguinho (70 km da capital), Dois Irmãos de Buriti (72 km) e Água Clara (184 km).

No passado, alguns isolados de cultura deste Centro de diagnóstico foram identificados por meio de perfil isoenzimático, descrito por Cupolilo (1994), como *L (L.) amazonensis*, *L (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (comentário pessoal Profa. Dra. Maria Elisabeth Dorval) e como descrito acima estas espécies já foram identificadas no estado em humanos, cães e flebotomíneos (DORVAL *et al*, 2006; NUNES *et al*, 1995; NUNES *et al.*, 2001; SAVANI *et al.*, 2009).

Os pacientes em sua maioria apresentavam Leishmaniose Tegumentar, como o caso de Corguinho, onde *L (V.) braziliensis* já foi identificada em casos humanos e em flebotomíneos (NUNES *et al.*, 1995; GALATI *et al.*, 1996).

Em Campo Grande, esta espécie foi identificada em material proveniente de duas crianças com Leishmaniose Visceral. Em animais de laboratório e eventualmente no homem, podem ocorrer quadros visceralizantes determinados também por espécies com tropismo preferencial cutâneo mucoso (ALMEIDA *et al.*, 1996).

Em defesa desta hipótese existem relatos da doença cutânea disseminada no homem em linfonodos, células sanguíneas e vísceras profundas (COSTA *et al.*, 1986; MORAES *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1992; SOUZA *et al.*, 1989).

Leishmaniose Visceral causada por *L.(V.) braziliensis* já foi descrita tanto em pacientes imunodeficientes (SILVA *et al.*, 2002; GONTIJO *et al.*, 2002) como em imunocompetentes (SAMPAIO *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1989). A habilidade desta espécie de produzir manifestações clínicas de amplo espectro pode ocorrer por diversos fatores, incluindo características intrínsecas do próprio parasita e do sistema imune do hospedeiro (GONTIJO *et al.*, 2002).

A escassez de relatos de *L. (V.) braziliensis* e Leishmaniose Visceral, seja talvez devida às poucas tentativas de isolamento e dificuldades associadas à cultura, como a baixa quantidade de parasitas nas vísceras (ALMEIDA *et al.*, 1996).

De acordo com Silva *et al.* (2008), os casos notificados em Campo Grande, podem ser de áreas rurais ou de outros municípios, mas a infecção urbana não deve ser descartada, pois espécies de importância médica como *Ny. whitmani*, vetor de *L.(V.) braziliensis*, estão presentes nesta região (OLIVEIRA, 2006).

Diante de tudo que foi dito as três espécies de leishmânias circulam na região, lembrando que de acordo com Weigle e Saraiva (1996), diversas espécies deste parasito podem circular em uma região, ocasionando quadros clínicos também diversos.

O pequeno número de isolados positivos deve ter sido em decorrência da baixa sensibilidade destas técnicas. Sabe-se que a positividade de isolamento de leishmânias em animais de laboratório varia de 38 % a 52 % (WEIGLE *et al.*, 1987).

Outro aspecto crucial é a maneira apropriada de preservação do DNA do material a ser utilizado, que consiste na facilidade de transporte

das amostras de um local para outro, mantendo sua integridade por longos períodos. Para tanto, devem ser mantidas condições de conservação, visando à manutenção de sua integridade por longos períodos, tais como, temperatura, material seco ou em algum tipo de reagente e tubos adequados de transporte com boa vedação.

As amostras que foram encaminhadas para nosso Laboratório chegaram em tubos criogênicos, que demonstraram não ser adequados para o envio de material de um local para outro, pois a vedação do mesmo não suportou o transporte, a maioria das amostras chegaram praticamente sem o tampão de conservação.

O tampão de conservação utilizado pode ser o mais adequado para armazenar o material por um período curto, mas para longos períodos talvez não seja indicado. Para conservações mais longas, são utilizadas substâncias como o formol, porém dependendo da técnica utilizada para a detecção de infecção por leishmânias e outros parasitos, este pode ter menor sensibilidade (ANDRADE *et al.*, 2001) e inclusão em parafina que apresenta maior estabilidade e parece manter a integridade do material por mais tempo, mas durante o processo de extração, pode-se ter perdas de DNA (AVILES *et al.*, 1999).

Com relação ao município de Bela Vista, no período de captura entre 2004 e 2006, encontrou-se *Bi. flaviscutelata* infectada e a taxa

mínima de infecção dos flebotomíneos por *L. (L.) amazonensis* foi de 0,6. Esta espécie de flebotomíneo é encontrada predominante em áreas florestais ao nível do solo e é preferencialmente zoofílica. É vetora reconhecida de *L. (L.) amazonensis*, transmitindo esta espécie de leishmânia entre roedores. É resistente a mudanças ecológicas, sobrevivendo em áreas reflorestadas (READY *et al.*, 1983).

Foram notificados nesta mesma área, em 2001, nove casos humanos de Leishmaniose Tegumentar, causada por *L. (L.) amazonensis*, os pacientes em sua maioria, eram soldados freqüentadores do local das capturas de flebotomíneos (DORVAL *et al.*, 2006). Durante o período deste estudo também foi isolada e identificada esta espécie de leishmânia em dois hamsters sentinelas das armadilhas utilizadas na captura dos insetos (DORVAL, 2006).

Além da cobertura vegetal predominante, são relatados nesta área, a presença de pequenos roedores, marsupiais, primatas e carnívoros, que talvez estejam incriminados no ciclo de transmissão do parasito (LAINSON e SHAW, 1987).

A taxa mínima de infecção de 0,24 % para outros tripanossomatídeos nestes flebotomíneos de campo, revela a existência de mais de um tipo de flagelado circulante, ressaltando a importância de

uma identificação espécie específica, para o conhecimento real das espécies envolvidas na transmissão da doença.

Nos cães de Bela Vista foram identificados 2 positivos para *L.(L.) amazonensis*, em um total de 10 amostras de tentativas de isolamento. Alguns cães apresentavam a forma visceral da doença; este fato está de acordo com a identificação desta espécie em cães, com condições clínicas similares a Leishmaniose Visceral causada por *L. (L.) infantum chagasi*, em Araçatuba São Paulo (TOLEZANO *et al.*, 2007).

Os relatos acima ampliam o conhecimento da transmissão desta parasitose no município de Bela Vista.

Em ambas as áreas de estudo, Campo Grande e Bela Vista, houve a identificação de leishmânia em flebotomíneos com preferência alimentar para animais de sangue frio *Sc. sordelli* e *M quinquefer* respectivamente (GALATI *et al.*, 1996). Resultado semelhante foi descrito na Índia, onde *Sergentomyia babu*, de hábito alimentar semelhante, foi encontrada infectada por *L.(L.) donovani* (MURKHERJEE *et al.*, 1997).

Apesar destas espécies e outras que foram identificadas infectadas por leishmânias, até o momento, não estarem envolvidas na transmissão das leishmanioses, vale ressaltar que na falta das fontes alimentares de

preferência, o inseto adapta sua alimentação a outras fontes, mudando seu hábito alimentar.

Na relação parasito-hospedeiro, o hábito alimentar do vetor é fundamental para a disseminação da leishmânia, sendo assim, seu conhecimento fornece informações ecológicas e se torna uma ferramenta necessária para a compreensão da epidemiologia da doença (FERREIRA, 1945).

A identificação do hábito alimentar dos vetores fornece não só informações sobre suas preferências alimentares, como a indicação de reservatórios potenciais. Em condições naturais o ciclo da leishmânia envolve um grande número de mamíferos, mais de 62 espécies (DEREURE, 1999) e das 1.000 espécies de flebotomíneos conhecidos, 20 são confirmadas como vetores eficientes (LEGER, 1999). O estudo do padrão alimentar destas espécies, fornece informações sobre os possíveis reservatórios de maneira mais rápida, pois normalmente em uma área, o isolamento do agente é realizado a partir do material colhido de vários animais, o que consome mais tempo e em áreas onde existem muitos animais torna-se extremamente difícil (HAOUAS *et al.*, 2007).

Em nosso estudo foi padronizado uma PCR-RFLP para identificação de hábito alimentar, que foi capaz de diferenciar 9 fontes alimentares (humano, galinha, camundongo, cavalo, gambá, capivara, porco, cachorro

doméstico e cachorro do mato) e amplificar o DNA de sangue ingurgitado por insetos, identificando alimentação de galinha em 68 % flebotomíneos capturados em Campo Grande – MS.

Este método já havia demonstrado boa eficiência em experimentos com carrapatos, diferenciando animais pertencentes a gêneros distintos (KIRSTEN e GRAY, 1996).

A identificação do hábito alimentar nos flebotomíneos é geralmente feita com a utilização de técnicas sorológicas, mas por ser mais sensível e específica, recentemente a PCR foi padronizada para este fim. O primeiro método de PCR desenvolvido foi baseado na amplificação e sequenciamento do gene de cópia única prepronociceptin (PNOC) para identificação de hospedeiros reservatórios de leishmânias (HAOUAS *et al.*, 2007). Mais recentemente, Sant'anna *et al.* (2008), utilizando como alvo o gene mitocondrial citocromo b, identificou alimentação de humano, galinha e cachorro, revelando alimentação por galinha em 53,6 % de insetos capturados em campo.

As principais dificuldades em desenvolver um método de identificação de fonte alimentar bem sucedido para flebotomíneos é que estes são insetos muito pequenos, ingerem quantidades mínimas de sangue (0,5 a 1 ul) e o processo de degradação progressiva do sangue ingerido é rápida (DABA *et al.*, 2004).

De acordo com a classificação proposta por Svobodova *et al.* (2003), existem três níveis de digestão de sangue nos flebotomíneos: 0-18 h – sangue fresco vermelho claro, 18-24 h – sangue parcialmente digerido vermelho escuro e 24-72 h – sangue digerido marrom.

Em nossos experimentos, foram identificadas alimentação em 68 % dos flebotomíneos ingurgitados, com uma perda de 32 % pelo processo de digestão, sendo observados, antes do processamento dos insetos, os três níveis de digestão.

Experimentos realizados com a técnica ELISA (ensaio imunoenzimático) detectaram alimentação de sangue até 24 horas após o repasto (Marassa *et al.*, 2004), já a PCR detectou alimentação até 48 horas após a alimentação (SANT'ANNA *et al.*, 2008), apresentando percentual de detecção de 100 %, 86 % e 66 % para os níveis de digestão 1, 2 e 3 respectivamente (HAOUAS *et al.*, 2007).

Apesar destes 68% de flebotomíneos de campo positivos para sangue de galinha não revelar totalmente o comportamento alimentar da *Lu. longipalpis* nesta área, pois estes flebotomíneos eram provenientes de uma única armadilha instalada em um galinheiro, este resultado valida a técnica para futuros estudos de campo.

As fêmeas de *Lu.longipalpis* já foram descritas como espécies de hábito alimentar eclético (ALEXANDER *et al.*, 2002; MORRISON *et al.*, 1993; QUINNEL *et al.*, 1992). Dentre as várias fontes alimentares desta espécie a galinha é uma fonte constante, sendo observado que a atração por estas aves eleva a densidade destes vetores nas proximidades dos galinheiros (SANT'ANNA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008 b; CARVALHO *et al.*, 2000).

Considerando os efeitos atrativos e protetores de certos animais com relação à transmissão da Leishmaniose, tanto a galinha como os cães são considerados fatores de risco (CORREDOR *et al.*, 1989; ARIAS, 1996; MOREIRA *et al.*, 2003).

Galinheiros atraem ambos, fêmeas e machos que buscam companheiras, podendo este se tornar um criadouro (SVOBODOVÁ *et al.*, 2003). Eles também atraem reservatórios potenciais de leishmânia (raposa, gambá e roedores), estando alguns casos protegidos por cães, amplificando o número de hospedeiros do parasito (ALEXANDER *et al.*, 2002).

Na literatura não existe nenhum relato de que aves sejam reservatórios de leishmânia, sendo consideradas refratárias à infecção. As galinhas possuem algumas características fisiológicas que impedem a infecção por leishmânia, que incluem a temperatura do corpo de 41 °C

(ZILBERSTEIN *et al.*, 1994). De acordo com Schlein *et al.* (1983) certos componentes do sangue das aves inibiram o desenvolvimento de *L. major* em *Phlebotomus papatasi*.

No processo de transmissão de leishmânia, em certas situações, estas aves são consideradas agentes zooprofiláticos (ALEXANDER *et al.*, 2002). Em algumas áreas endêmicas de Leishmaniose outros animais (boi e porco) também são considerados zooprofiláticos, pelo fato da preferência dos flebotomíneos por estes animais parecer reduzir a incidência de doença (MORRISON *et al.*, 1993, GHOSH *et al.*, 1990).

O entendimento do papel de animais domésticos como a galinha, no ciclo de transmissão da Leishmaniose é muito importante, devendo ser bem avaliado, pois estes animais estão sempre muito próximos ao homem e proibir a criação em cidades brasileiras, removeria uma potencial fonte de alimento e renda para os habitantes de baixa renda (ALEXANDER *et al.*, 2002).

Acreditamos que os resultados e as discussões advindas deste projeto possam contribuir no desenho de futuros estudos e medidas de controle desta doença no Estado do Mato Grosso do Sul.

6 CONCLUSÕES

1- A utilização da enzima de restrição *HaeIII* em produtos amplificados para gênero leishmânia, foi capaz de diferenciar *L.(V.) braziliensis* de *L.(V.) guyanensis*.

Área urbana de Campo Grande

2- No período entre 2003 e 2005 foram identificadas, taxas de infecção mínima de 1,6% para *L.(V.) braziliensis* e 0,38% de *L.(L.) amazonensis* em flebotomíneos capturados em peri e intradomicílio.

3- *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* foram identificadas infectadas por *L.(V.) braziliensis* na região sul da Capital.

4- *Lu. longipalpis* foi identificada infectada por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*.na região oeste.

5- Isolados humanos foram identificados positivos para *L.(V.) braziliensis* em Campo Grande e outros municípios.

Área Militar de Bela Vista (MS)

6- Foram detectadas, nos flebotomíneos, taxas mínimas de infecção para *L.(L.) amazonensis* de 0,6% e 0,24% para outros Tripanosomatídeos.

7- Foram identificadas infectadas *Bi. flaviscutelata* e *Ny. whitmani*, vetores reconhecidos de Leishmaniose Tegumentar.

8- Os isolados de cães foram identificados infectados por *L.(L.) amazonensis*.

Padronização PCR-RFLP para hábito alimentar

9- Foi capaz de diferenciar as amostras de sangue das nove fontes alimentares testadas.

10- Amplificar DNA mitocondrial de sangue ingurgitados por insetos.

11- Identificar a galinha como fonte alimentar em 68% dos flebotomíneos capturados em campo.

REFERÊNCIAS:

ALEXANDER, J. B.; DE CARVALHO, R. L.; MC CALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.1480-1485, 2002

ALMEIDA, M.C.; CUBA-CUBA, C.A.; MORAES, M.A.; MILES, M.A. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J. Comp. Pathol.*, v.115, n.3, p.311-316, 1996.

AMATO, V. S.; DE ANDRADE, H.F.; DUARTE M. I . Mucosal *Leishmaniasis*: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* v., 85, n. 1, p. 39-49, 2003.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n.5, p.1933-8, 2000.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.2, n.2, p.145-146, 1996.

ARRUDA, W.; COSTA, F.C.; NAHAS, S.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral. *Bras. Méd.*, v.63, p.64-65, 1949.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASHFORD, R.W. The *Leishmaniasis* as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p. 1269-1281, 2000.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasitol.*, v.85, n.2, p.181-187, 1999.

BLACKWELL, A.; BROWN, M.; MORDUE, W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* bloomeals in host-preference studies. *Med. Vet. Entomol.*, v.9, p.214-218, 1995.

BRAGA, R. R; LAINSON, R.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SHAW, J. J. *Leishmania (Viannia) utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Viannamyia) tubercuLata* in Amazonian Brazil. *Parasite*, v. 10, p. 111-118, 2003.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia. In: RANGEL, E.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2003. p. 257-274.

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. - Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.58, p.102-109, 1998.

BOSENSO, M. F.; GARCIA, L. S.; BAURNAURE, F.; GASTELÚM, E. M.; GUTIERREZ, M. S.; KASTEN, F. L.; DUMONTEIL, E.; BRENIERE, S. F.

Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.74, p.303-305, 2006.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In COOK, G.C. *Manson's Tropical Diseases*. WB Saunders London, 1996, p.1213-1245.

CABRERA, O.L.; MUNSTERMAN, L.E.; CARDENAS, R.; GUTIERREZ, R.; FERRO, C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomedica*, Bogota, v.22, n.3, p.296-302, 2002.

CACERES, A.G.; VILLASECA, P.; DUJARDIN, J.C.; BAÑULS, A. L.; LOPEZ, R.I.M.; ARANA, M.; RAY, D.L.; AREVALO, J. Epidemiology of Andean Cutaneous *Leishmaniasis* :Incrimination of *Lutzomyia ayacuchensis* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania* in geographically isolated, upland valleys of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 70, n. 6, p. 607-612, 2004.

CALDAS, A.J.; COSTA, J.M.; SILVA, A.A.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, n.1, p.21-28, 2002.

CARVALHO, M. L.; REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. C.; BARROS, V. L. L. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomol. Vect.* v. 7, p.19-32, 2000.

CASANOVA, C.; COSTA, A.I.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.100, n.7, p.719-724, 2005.

CASTILHO, T.M.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CHAGAS, E.; CHAGAS, A.W. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral americana em Mato Grosso. *Hospital.*, v.13, p.471-80,1938.

CHOW, E.; WIRTZ, R.A.; SCOTT, T.W. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v.9, n.2, p.196-205, 1993.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. Ed.Atheneu, 1999, p.39-80.

CIPA GROUP. BERMUDEZ, H.; DEDET, J. D.; FALCÃO, A. L.; FELICIANGLI, D.; FERRO, C.; GALATI, E. A. B.; GOMES, E. L.; HERRERO, M. V.; HERVAS, D.; LEBBE, J.; MORALES, A.; OGUZUKU, E.; PEREZ, E.; RANGEL, E F.; SHERLOCK, I. A.; TORRES, M.; VIGNES, R.; WOLFF, M. (<http://cipa.snv.jussieu.fr/accueil.html>) acesso em 1999.

CORREDOR, A.; GALLEGO, J.F.; TESH, R.B.; CARRASQUILLA, C.; F.; YOUNG, D. G.; KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAU, M. T.; CACERES, E., PELAEZ, D. . Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.40, n.5, p. 480-486, 1989.

CORTADA, V.M.; DORVAL, M. E.; SOUZA, L. M. A; OSHIRO, E. T.; MENESES, C. R. V.; ABREU-SILVA, A. L.; CUPOLILO, E.; SOUZA C. S. F.; CARDOSO, F. O.; ZAVERUCHA, V. T.; BRAZIL R. P.; CALABRESE, K. S.; GONÇALVES, C. S. C. Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Vet. Res. Commun.*, v.28,n.5, p.365-374, 2004.

COSTA, J.M.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; NETTO, E.M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHAES, A. V.; BARRETO, A. C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.89, n.6, p.319-323, 1986.

COULSON, R. M.; CURTIS, C. F.; READY, P.D.; HILL, N.; SMITH D.F. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Med. Vet. Entomol.*, v.4,n.4, p.357-66, 1990.

CUPOLILO, E.; GRIMALDI, Jr.G.; MOMEN, H. A. General classification of the New World Leishmanias using numerical zootaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.50, n.3, p.296-311, 1994.

DABA, S.; DABA, A.; SHEHATA, M.G.; EL SAWAF, B.M. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sandfly, *Phlebotomus*

langeroni (Diptera: Psychodidae). *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, v.34, p. 173–182, 2004.

DA SILVA, A.L.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N.; MAYRINK, W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* (Ross, 1903). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 85, n. 4, p. 453-458, 1990.

DE ANDRADE AS, GOMES RF, FERNANDES O, DE MELO MN. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.*, v.78, n.3, p.261-267, 2001.

DEANE, L.M. *Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará*. Tese (Livre-Docência) - Universidade de São Paulo, São Paulo; 1956.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of Molecular Probes and PCR for Detection and Typing of *Leishmania* – a Mini-Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.89, n.3, p.463-469, 1994.

DEREURE, J. Réservoirs de leishmanies. In : DEDET, P. (Ed). *Les Leishmanioses*. Second edition. Paris: AUPELF-UREF, 1999, p.109–130.

DORVAL, M.E.M.C. *Estudos epidemiológicos em área de leishmaniose tegumentar no município de Bela Vista, estado do Mato Grosso do Sul*,

Brasil. Tese de doutorado (Programa Multiinstitucional de pós-graduação em ciências) - Universidade do Mato Grosso do Sul, 2006.

DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Mato Grosso do Sul, associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39,p.43-46, 2006.

EDRISSIAN, G. H.; HAFISI, A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of Anopheles mosquito bloodmeals. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, v.76,n.1, p.54-56, 1982.

ESTRADA-PEÑA, A.; OSÁCAR, J. J.; PICHON, B.; GRAY, J. S. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in north-central Spain. *Exp. Appl. Acarol.*, v.37, p.257-268, 2005.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: FOCCACIA, R.; DIETZE, R. (Ed). *Doenças Infeciosas e Parasitárias*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991, p.750-762.

FERNANDEZ, O.; MURPHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W. M. & CAMPBELL, D. A . Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v. 66, p.261-271, 1994.

FERREIRA, F. S. C. A reação das precipitinas aplicadas aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. *Anais do Inst. Med. Trop.*, v.2, p.187-196, 1945.

GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematic of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. San Amlo.*, v.35, n.1, p.133-142, 1995.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p.23-51.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNOLA, M. A.; ROCHA, H. C.; GARCIA, W. B.. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Publ.*, v.30, p.115-128, 1996.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Publ.*, v.31, p.378-390, 1997.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; GONÇALVES-ANDRADE, R. M.; NAUFEL, G. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.*, v.47, p. 283-296, 2003.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; DAMASCENO-JUNIOR, G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.101, p.175–193, 2006.

GARCIA-MISS, M.R.; ANDRADE-NARVAEZ, F.J.; ESQUIVEL-VIÑAS, R.E.; SIMMONDS-DIAZ, E.B.; CANTO-LARA, S.B.; CRUZ-RUIZ, A.L. Localized cutaneous leishmaniasis (Chiclero's ulcer) in Mexico: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies to *Leishmania mexicana*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.84, p.356-358, 1990.

GARNHAM, P.C.C. Introduction. In: PETERS W.; KILLICK-KENDRICK R. (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. vol I. Orlando: Academic Press, 1987, xiii-xxv.

GHOSH, K.N.; BHATTACHARYA, A.; GHOSH, T.N. Blood meal analysis of *Phlebotomus argentipes* in eight districts of West Bengal. *J. Commun. Dis.*, v.22, n.1, p.67-71, 1990.

GOMES, L.A.; DUARTE, R.; LIMA, D. C.; DINIZ, B. S.; SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatis* (Lutz) mosquitos experimentally fed on feline, canine and humans hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.96, p.693-695, 2001.

GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; OREFICE, F.; LASMAR, E.; SILVA, E.S.; MELO, M.N. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.97, n.5, p.751-753, 2002.

GOVERNO DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. (WWW.MS.GOV.BR/), acesso em 2009.

GRAMICCIA, M.; BETTINI, S.; YARASOL, S. -Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from human cases of cutaneous leishmaniasis in Urfa, south-east Turkey. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.78, p.578, 1994.

GREVELINK, A.S.; LERNER, E.A. -Leishmaniasis. *J. Am. Academy of Dermatol.*, v.34, p.257-272, 1996.

GUIA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição ampliada, 2005.

HANHAM, C.A.; ZHAO, F.; SHAW, J.J. & LAINSON, R. -Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.85, p.220, 1991.

HAOUAS, N.; PESSON, B.; BOUDABOUS, R.; DEDET, J. P.; BABBA, H.; RAVEL, C. Development of a molecular tool for the identification of

leishmania reservoir host by blood meal analysis in the vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.77, n.6, p.1054-1059, 2007.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B. & AGABIAN, N. Single step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.7, p. 1989-1995, 1998.

HERWALDT, B.L. -Leishmaniasis. *Lancet*. v.354, p.1191-99, 1999.

IRWIN, D.M.; KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, v.32, p.128-44, 1991

JORQUERA, A.; GONZALEZ, R.; MARCHAN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.100, n.1, p.45-48, 2005.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.*, v.22, n.9, p.439-445, 2006;.

KENT, R. and NORRIS, D. E. Identification of Mammalian Blood Meal in Mosquitos by a Multiplex Polymerase Chain Reaction Targeting Cytochrome B. *Am. J. Med. Hyg.*, v.73, n.2, p.336-342, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.*, v.78, n.5, Pt.2, p.747-55, 1985.

KILLICK-KENDRICK, R. and WARD, R. D. Ecology of Leishmania. *Parasitology*, v.82, p.143-152, 1981.

KIRSTEIN, F. and GRAY, J. S. A Molecular Marker for the Identification of the Zoonotic Reservoirs of Lyme Borreliosis by Analysis of the Blood Meal in Its European Vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiol.*, v.62, n.11, p.4060-4065, 1996.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: SERVICE, M.W., editor. *Demography and vector-borne disease. Boca Raton (FL): CRC Press, 1989, p. 85-106.*

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In W PETERS, R KILLICK-KENDRICK (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, v.1, Academic Press, London, 1987, p.1-120

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Chapter 17. New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D.; eds. *Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, Sydney, Auckland, 2005, p.313-349.

LEGER, N.; DEPAQUIT, J. Les phlébotomes. In: DEDET, J.P. (Ed). *Les Leishmanioses*. First edition. Paris: AUPELF-UREF, 1999, p.89–108.

LEMOS, J. C.; LIMA, S. C.; COSTA, M. B.; MAGALHÃES, M. J. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna Flebotomínica em áreas de transmissão na município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Caminhos de Geografia- Revista on Line*. v.2, n.3, p.57-73, 2001.

MAGILL, A.J. Leishmaniasis. In: STRICKLAND, G.T. (Eds). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 8th edition, W.B.Sauders, Philadelphia, 2000, p. 665-687.

MARASSA, A.M.; CONSALES, C.A.; GALATI, E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method standardization, for identification of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* blood-meals (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p.441–446, 2004.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N D.; BECK, H P.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v.46, p.115-124, 2003.

MARTINEZ JE, ALBA, ARIAS L, ESCOBAR MA, SARAVIA NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.86, n.4, p.392-394, 1992.

MATO GROSSO DO SUL (ESTADO). Secretaria de Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. *Relatório de notificações de Leishmaniose* (www.saude.ms.gov.br/).

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

MIGONE, L.E. Um caso de kalazar a Assuncion (Paraguai). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.6, p.118-120, 1913.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M. G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL A. Frequency of Infection of *Lutzomia* Phlebotomines with *Leishmania brasiliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by Pinpoint Capture and Polimerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97,n.2, p.185-188, 2002.

MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G.; ARMSTRONG, P. M.; DIUK-WASSER, M. Host- feeding patterns of potencial mosquitos vectors in Connecticut, USA.: molecular analysis of bllomeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora* and *Uranotaenia*. *J. Med. Entomol.*, v.45, n.6, p.1143-1151, 2008.

MOLINA, R.; LOHSE, J.M.; PULIDO, F.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; ALVAR, J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.60, n.1, p.51-53, 1999.

MORAES, M.A.; CORREIA FILHO, D.; SANTOS, J.B. Lymphadenopathies in American cutaneous leishmaniasis: comments on 2 cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.26, n.3, p.181-185 1993.

MOREIRA ED, JR., DE SOUZA VM, SREENIVASAN M, LOPES NL, BARRETO RB, DE CARVALHO LP. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.69, n.4, p.393-397, 2003.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.49, n.1, p.68-75, 1993.

MUKHERJEE, S.; HASSAN, M. Q.; GHOSH, A.; GHOSH, K. N.; BHATTACHARYA, A.; ADHYA, S. *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-zar epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.57, n.4, p.423-425, 1997.

MWANGANGI, J.M.; MBOGO, C. M.; NZOVU, J. G.; GITHURE, J. I.; YAN, G.; BEIER, J. C. Blood- meal analysis for anopheline mosquitoes sampled

along the Kenyan coast. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v.19, p.371-375, 2003.

NADIM, A. & FAGHIH, M. -The epidemiology of cutaneous *Leishmaniasis* in the Isfahan province of Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, p. 534-549, 1968.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. Ed.Atheneu, 8º edição, 1991, p.370-382.

NUNES, V.L.B. *Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998, 1999*. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo, 2001.

NUNES, V.L.; DORVAL, M.E.; OSHIRO, E.T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINI, L. N.; SANTOS, D. Epidemiologic study on tegumentary leishmaniasis in the municipality of Corguinho, Mato Grosso do Sul - Studies in the human population. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.28, n.3, p.185-193, 1995.

NUNES V. L. B.; GALATI E. A. B.; CARDOZO C.; ROCCA M. E. G.; ANDRADE A. R. O.; SANTOS M. F. C.; AQUINO R. B., ROSA D. Study of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the urban area of Bonito municipality, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. entomol.*, v.52, n.3, 2008.

NUNES, V.L.; GALATI, E.A.; NUNES, D.B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'ÁURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.3, p. 299-300, 2001.

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

OLIVEIRA, A.C. Um caso de leishmaniose visceral americana. *Hospital*, v.13, p.465-470, 1938.

OLIVEIRA, A.G. *Estudos ecológicos de phlebotominae (Díptera: Psychodidae) na área urbana do município de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul*. Tese (Doutorado do Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, FICRUZ, 2006.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE FILHO, J.D.; FALCAO, A.L.; BRAZIL, R.P. Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000. *Cad Saude Publ.*, v.19, n.4, p.933-944, 2003.

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

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

OLIVEIRA, A.G.; MARASSA, A.M.; CONSALES, C.A.; DORVAL, M. E. C., FERNANDES, C. E.; OLIVEIRA; G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.*, v.107, n.3, p.238-241, 2008 b.

OLIVEIRA, A.L.; PANIAGO, A.M.; DORVAL, M.E.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. . Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.5, p.446-450, 2006.

PAIVA, B.R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTTE, R. S.; ANDRADE JR, H. F(b). Single step polymerase chain reaction (PCR) for the

diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo*, v.46, n.6, p.335-338, 2004.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; MALAFRONTTE, R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.*, v.99, n.2-3, p.252-259, 2006.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; GALATI, E.A.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; MALAFRONTTE, R. DOS S. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae). *Cad Saude Publ.*, v.23n.1, p.87-94, 2007.

PERKINS, S. L. & SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.*, v.88, p.972-978, 2002.

PETERS, W. and KILLICK-KENDRICK R. (eds.) *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. vols. I and II. Londres and New York: Academic Press, 1987.

PIMENTA, P.F.; SARAIVA, E.M.; ROWTON, E.; MODI, G.B.; GARRAWAY, L.A.; BEVERLEY, S.M.; TURCO, S.J.; SACKS, D.L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface

lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, v.91, n.19, p.9155-9159, 1994.

PIÑERO, J.; MARTINEZ, E.; PACHECO, R.; ARAGÓN, Z.; DE ARMAS, F.; DEL CASTILLO, A. & VALLADARES, B. -PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, v.73, p.21-29, 1999.

PIRMEZ, C.; TRAJANO, V.S.; NETO, M.P.O.; CRUZ, A.M.; COSTA, S.C.G.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W. & FERNANDES, O. -Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.1819-1823, 1999.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M.A.; ALVES, C.R.; BRAZIL, R.P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.*, v.107, n.1, p.66-69, 2008.

QUINNELL RJ, DYE C, SHAW JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.*, v.6, n.3, p.195-200, 1992.

READY, P.D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, v.16, n.5, p.413-423, 1979.

READY PD, LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of "pian bois" (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forests in eastern Amazonia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.77, n.6, p.775-785, 1983.

REED, S.G. Diagnosis of Leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v.14, n.5, p.471-478, 1996.

REY, L. *Parasitologia*. Ed. Guanabara e Koogan, 3º edição, 2001, p.698-701.

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

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS, M.A. and BARKER, D. C. Detection of *Leishmania (V.) braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 93, p. 47-49, 1999.

RODRIGUEZ, N.; LIMA DE, H.; RODRÍGUEZ, A.; BREWSTER, S. and BARKER, D. C. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology*, v.115, p.349-358, 1997.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v.124, p.495-507, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.55, p.453-483, 2001.

SAMPAIO, R.N.R.; PIRES, J.A.; SAMPAIO, J.H.D.; MAGALHÃES, A.V. Visceralização da Leishmaniose Cutaneomucosa Disseminada causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* em paciente imunocompetente. *Anais Bras. Dermatol.*, v.72, n.6, p.579-582, 1997.

SANCHEZ, M. J.; LOPEZ, L. M. C.; SANCHEZ, A C.; FAJA, C. J.J.; PINEDA, J. A.; MARQUEZ, M.F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*, v.122, n.6, p.607-615, 2001.

SANCHEZ, J.L.; DINIEGA, B.M.; SMALL, J.W.; MILLER, R.N.; ANDUJAR, J.M.; WEINA, P.J.; LAWYER, P.G.; BALLOU, W. R.; LOVELACE, J.K. Epidemiologic Investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.47, n.1, p.47-54, 1992.

SANT'ANNA, M.R.; JONES, N.G.; HINDLEY, J.A.; MENDES-SOUSA, A. F.; DILLON, R. J.; CAVALCANTE, R.; ALEXANDER, B.; BATES, P. A. Blood

meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop.*, v.107, n.3, p.230-237, 2008.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; DE PAIVA, H.M.; DE FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.12, n.3, p.315-317, 1998.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; HOFFMANN, M.P.; FURLAN, M.B.G.; FERREIRA, W.F.; PEREIRA, C.; FERREIRA, L.S. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumba, Mato Grosso do Sul State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.5, p.633-634, 2003.

SAVANI, E.S.; NUNES, V.L.; GALATI, E.A.; CASTILHO, T.M.; ZAMPIERI, R.A.; FLOETER-WINTER, L.M. 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. *Vet Parasitol.*, v 160, n.1-2, p.18-24, 2009.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A.; SCHNUR, L.F.; SHLOMAI, J. Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* dependent on differentially induced digestion. *Acta Trop.*, v.40, n.1, p.65-70, 1983.

SHANNON, R. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. *Am. Journ. Trop. Med.*, v.19, p.131-140, 1939.

SHAW, J.J. & LAINSON, R. -Ecology and Epidemiology: New World. In PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol I. Academic Press, Orlando, 1987, p.291-363.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral *Leishmaniasis* in the State of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 97, p. 671-683, 1996.

SILVA, A. C.; GOMES, A C. Estudo da competência vetorial de *Lutzomia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania(Viannia) braziliensis*, Vannia,1911. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, v.34, n.2, p.187-191, 2001.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Behavior of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.40, n.4, p.420-425, 2007.

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

SILVA, E.S.; PACHECO, R.S.; GONTIJO, C.M.; CARVALHO, I.R.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.44, n.3, p.145-149, 2002.

SINAN/SVS/MS-2008,

(www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_lta.pdf) acesso em 2008.

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

SOUSA, A.Q.; FAÇANHA, M.C.; POMPEU, M.L. *et al.* Visceral leishmaniasis in Ceará caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mcm. Inst. OswaldoCruz.*, v.84, Suppl II, p.35, 1989.

SVOBODOVA, M.; SADLOVA, J.; CHANG, K.P.; VOLF, P. Distribution and feeding preference of the sandflies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.68, p.6-9, 2003.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.; TANIGUCHI, H.H.; ARAUJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.A.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.*, v.149, n.3-4, p.280-284, 2007.

TYLER, D. D. *Mitochondria in the cell*. In: The mitochondrion in health and disease. VCH Publishers Inc., New York, 1992, p. 95-146.

UEZATO, H.; HAGIWARA, K.; HOSOKAWA, A.; MARUNO, M.; NONAKA, S.; OSHIRO, M.; FURUYA, M.; GOMEZ, E.A.; & HASHIGUCHI, Y. -A preliminary study aimed at the detection of *Leishmania* parasites in subjects with cutaneous leishmaniasis using polymerase chain reaction. *J. of Dermatol.*, v.25, p.290-298, 1998.

UEZATO, H.; HAGIWARA, K.; HOSOKAWA, A.; MARUNO, M.; NONAKA, S.; OSHIRO, M.; NAKASHIMA, Y.; FURUYA, M.; HASHIGUCHI, Y. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and southern blotting. *J. Dermatol.*, v.25, p.623-631, 1998.

ULIANA, S. R. B.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P. and FLOETER-WINTER, L. M.. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Euk. Microbiol.*, v.41, p.324-330, 1994.

VAN EYS, G. J. J. M.; SCHOONE, G. J.; KROON, N. C. M. & EBELING, S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Biochemical Parasitol.*, v.51, p.133-142, 1992.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.*, v.23, n.3, p.91-92, 2007.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; ROMANHA, J. A. Attempt to differentiate *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L (L) chagasi*,

Leishmania (Viannia) brasiliensis and *Leishmania (V) guyanensis* using the SSR-PCR technique. *Parasitol Res.*, v.87, p.1056-1059, 2001.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.48, p.449-470, 1994.

WEIGLE, K.A.; DE DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIDA, N.G.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.36, n.3, p.489-496, 1987.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, A. L.; LOSANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D. C. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.601-606, 2002

WEIGLE, K.A.; SARAVIDA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v.14, n.5, p.433-450, 1996.

WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infection. *Clin. Microbiol. Reviews*, v.8 p,113-130, 1995.

WHO/OMS (www.who.int/topics/leishmaniasis/en), acesso 2008.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res.*, v.18, p.6531-6535, 1990.

YARZON, R.M.; DORVAL, M.E.; DE FREITAS, H.G.; OSHIRO, E.T. American leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.2, p.41-42, 2003.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the west Indies, Central and South American "Diptera: Psychodidae". *Mem. Am. Entomol. Inst.*, v. 54, p. 1-81, 1994.

ANEXO

Seqüências (clonagem)

HUMANO

CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAACTTACTAT
CCGCCATCCCATACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT
ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATCTT
GCCCTTCATTATTGCGAGCCCTAGCAGCACTCCACCTCCTATTCTTGCACGAA
ACGGGATCAGACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAATCACC
TTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTCCTCCTTC
TCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGGGCGACCCAGA
CAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCCACATCAAACCCGAA
TGATATTTCTATTTCGCCTACACAATTCTCCGATCCGTCCCTAACAACTAG
GAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCTAGCAATAATCCCCAT
CCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTGCCCCACTAAGCCAATCA
CTTTATTGACTCCTAGCCGCAGACCTCCTCATTCTAATCTGAATCGGGGGC
CAACCAGTAGAACACCC

GAMBÁ

CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGCGCAACAGTTATTAACCTATTAT
CTGCTATCCCCTATATCGGAAATACATTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGATT
CTCCGTTGACAAAGCCACCCTAACCCGATTTTTCGCATTCCACTTTATTCTT
CCATTTATCATTCTAGCTATAGTAGTAGTACATCTTCTATTTCTCCACGAAAC
TGGATCAAACAATCCAACAGGCCTAGATCCCAACTCAGATAAAATCCCATTT
CATCCCTATTATACTATCAAAGATATCCTAGGCCTATTCTAATAATTATTAT
CCTATTATCATTAGCAATATTCTCACCAGATCTTTTAGGAGACCCAGACAAC
TTCACCCCCGCTAATCCCCTCAACACCCACCTCATATCAAGCCAGAATGA
TATTTCTATTTGCCTATGCCATCCTACGATCAATTCCAAACAATTAGGAGGA
GTTTTAGCCCTACTATCATCCATTTAATCCTCCTTATTATGCCTTTATTACAC
ACATCAACCCAACGAAGTATAATATTTGACCCATCTCACAATCACTATTCT
GGATACTAACAGCTAATCTAATTATTCTTACCTGAATCGGAGCCAGCCAGTT
GAACACCC

CACHORRO DO MATO

CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCAACTGTAATCACTAATCTACTCT
 CTGCCATCCCCTACATCGGAACTAATCTGGTAGAATGAATCTGAGGCGGCT
 TTTCAGTAGACAAAGCAACCCTAACACGATTCTTTGCGTTCCACTTCATCCT
 TCCATTCATCATTATAGCCCTAGCAATAGTACATCTTCTATTTCTTCACGAAA
 CCGGATCCAACAACCCCTCAGGAATCACATCAGACTCAGACAAAATCCCAT
 TCCACCCTTACTACACAATCAAAGACATCCTAGGAGCCTTATTCTTACTCCT
 AATCTTAATATCACTAGTTCTATTCTCACCAGACCTATTAGGAGACCCTGATA
 ACTACATTCCCGCAAATCCCCTTAGTACCCCTCCACATATTAACCCGAATG
 ATATTTCTATTTGCCTACGCTATCCTACGGTCTATCCCTAACAAACTAGGA
 GGTGTACTAGCCCTAGTATTCTCCATTCTGATCCTAGCACTCATTCCCCTTT
 TCCACACATCCAAGCAACGTAGCATAATATCCGACCCCTTAGCCTATGCCT
 ATTCTGACTTTTAACCGCCGACCTTCTTACTTTAACATGAATTGGAGGCCAG
 CCAGTTGAACACCC

PORCO

GAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCNG
 CTATCCCTTATATCGGAACAGACCTCGTANAATGAATCTGAGGGGGCTTTTC
 CGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTCGCCTTCCACTTTATCCTACCA
 TTCNNCNTTACCGCCCTCGCNGCCGNACNTCTCCTATTCTGACGAAACC
 GGATCCAACAACCCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACNAAATTCCATTTC
 ACCCATACTACACTATTAANGANN TTCNAGGAGCCTTATTTATAACTAATC
 CTACTAANCCNTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCNGANNAC
 TACNCCCCAGCAAACCCACTAAACACCCACCCCATATTAACCCANAATGAT
 ATTTCTTATTCGCCNACGCTATTCTACGTTCAANTTCCTAATAAACTAGGTGGA
 GTGTTGGCCCTAGTAGCCTCCATCCTAATCCTAATTTAATGNCCATACTAC
 ACACATCCNAACAACGAGGCATAATATTCGACCACTAAGTCAATGCCTATT
 CTGANNACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGNNGCCAACC
 AGTAGAAC

CÃO

CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACTGTAATCACTAATCTTCTCT
 CTGCCATCCCTTATATCGGAACTGACTTAGTAGAATGGATCTGAGGCGGCT
 TCTCAGTGGACAAAGCAACCCTAACACGATTCTTTGCATTCCATTTTCATCCT
 CCCTTTCATCATCGCAGCTCTAGCAATAGTACACCTCCTATTTCTACACGAA
 ACCGGATCCAACAACCCCTCAGGAATCACATCAGACTCAGACAAAATTCAT
 TTCACCCTTACTACACAATCAAGGATATCCTAGGAGCCTTACTCCTACTCCT
 AATCCTAATATCACTAGTTTTATTTTCACCTGACCTATTAGGAGACCCAGATA
 ACTACACCCCTGCAAACCCCTAAACACCCCTCCACATATTAACCTGAGT
 GATATTTTCTATTCGCCTATGCTATCCTACGATCCATTCTAATAAATTAGGA
 GGTGTACTCGCCCTAGTATTCTCCATCCTAATCTTGGCATTCAATCCACTCC
 TCCACACATCTAAGCAACGCAGCATAATATCCGGCCCTTAGCCAATGCC
 TATTCTGACTTTTAGTCGCCGATCTTCTCACTTTAACATGAATTGGGGGCCA
 GCCAGTAGAACACCC

GALINHA

TGGACACACCCTAGTAGAGTGAGCCTGAGGGGGATTCTCAGTCGACAACC
 CAACCCTTACCCGATTCTTCGCCTTACACTTCTCCTCCCCTTTGCAATCGC
 AGGTATTACTATCATCCACCTCACCTTCTACACGAATCAGGCTCAAACAAC
 CCCCTAGGCATCTCATCCGACTCTGACAAAATTCCATTTACCCATACTACT
 CCTTCAAAGACATTCTGGGCTTAACTCTCATACTCACCCCATTCCTAACACT
 AGCCCTATTCTCCCCAACCTCCTAGGAGACCCAGAAAACCTTCACCCCAGC
 AAACCCACTAGTAACCCCCCACATATCAAACCAGAATGATATTTTCTATTC
 GCCTATGCCATCCTACGCTCCATCCCCAACAACTTGGAGGTGTACTAGCC
 CTAGCAGCCTCAGTCCTCATCCTCTTCTAATCCCCTTCTCCACAAATCTA
 AACAAACGAACAATAACCTTCCGACCACTCTCCCAAACCTTATTCTGACTTCT
 AGTAGCCAACCTTCTTATCCTAACCTGAATCGGAAGCCAACCAGTAGAACA
 CCCCTTCATCATCATTGGCCAAATAGCATCCCTCTCTTACTTCACCATCCTA
 C TTATCCTCTT

CAMUNDONGO

CCCCTTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATTACAAACC
 TCCTATCAGCCATCCCATATATTGGAACAACCCTAGTCGAATGAATTTGAGG
 GGGCTTCTCAGTAGACAAAGCCACCTTGACCCGATTCTTCGCTTTCCACTT
 CATCTTACCATTTATTATCGCGGCCCTAGCAATCGTTCACCTCCTCTTCCTC
 CACGAAACAGGATCAAACAACCCAACAGGATTAAACTCAGATGCAGATAAA
 ATTCCATTTACCCCTACTATACAATCAAAGATATCCTAGGTATCCTAATCAT
 ATTCTTAATTCTCATAACCCTAGGATTATTTTCCCAGACAATACTAGGAGAC
 CCAGACACTACATAACCAGCTAATCCACTAAAACACCCCCACCCCATATTAAC
 CCGGAATGATATTTCTATTTGCATACGCCATTCTACGCTCAATCCCCAATA
 AACTAGGAGGTGTCCTAGCCTATCTTTATCTTATTCTAATTTAGCCCTAATA
 CCTTTCCTTACCTTCAAGCAACGAAGCCTATTATTCCCCATCCCCAAATTTT
 GTACTGAATCCTTAGAACCCAACCTACTACTAACC CGGAAT

CAPIVARA

AATATCATTCTGAGGCACCACAGTAATTACAAATCTCTTATTANCTCTCCCTT
 ATATTGGAACAATACTCGTTGAATGAATCTGAGGAGGTTTCTCAGTTGACAA
 AGCCACCCTCACACGCTTCTTCTTCGCCTTTCACTTCTCCTCCCCTTTATCA
 TCGCAGCCCTTGTCATAGTGCACCTCTTATTCCTTCACGAAACCGGATCAAA
 CCACCCCTCAGGACTCAATTCAGACTCTGATAAAAATCCCATTTACCCCTTAC
 TATGCAATTAAAGACGTTTTAGGATTACTATTCATAATACTAGCACTCCTGGG
 CTTAGCCCTCTTTTTACCCGACCTCCTCGGCGACCCAGATAACTACACCCT
 AGCCAACCCTCTAAATACGCCCCACACATTAAGCCACAGTGATACTTCTCA
 TTCGCCTATGCAATTCTCCGCTCCATCCCTAATAAACTAGGAGGAGTATTAG
 CCCTCGTACTCTCAATCTTAATCTTAGCCCTATTCCCAATACTTCACCTATCT
 AAACAACGCAGCATAACATTCCACCCTCTCAGCCAATGCCTCCCTTTGACTA

CTAGTGGCCNACCTCATTATCCTTACATGAATTGGGGGCCAACCAGTCGAA
CACCC