**Aspectos da transmissão de leishmanioses no
Assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquena,
Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002-03.
Infecção natural em animais domésticos e vetores.**

Elisa San Martin Mouriz Savani

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia
Orientadora: Prof^a Dra. Eunice Aparecida Bianchi
Galati

São Paulo

2004

45454/2005 doe

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores. Ao usá-lo, cite a fonte.

Assinatura:

Data: 30 de agosto de 2004

“Eu é que sei que pensamentos tenho a vosso respeito, diz o Senhor, pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que desejais. Então me invocareis, passareis a orar a mim, e eu vos ouvirei. Buscar-me-eis, e me achareis, quando me buscardes de todo o vosso coração”.

Jeremias 29: 11- 13

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo que abriu as portas, me capacitou, fortaleceu e me deu bom êxito em todas as etapas. Se não fora a Sua intervenção esta obra não teria sido realizada.

À Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, pela orientação, amizade, colaboração e auxílio em todas as etapas do projeto.

À Dra. Vânia Lúcia Brandão Nunes da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), pela oportunidade de realizar este trabalho, pela execução dos trabalhos de campo e de laboratório de parasitologia, pela amizade e carinho.

À Dra. Lucile M. Flöeter Winter do ICB/USP pela orientação e colaboração, aos colegas Isabel Cristina Alves e Thiago M. Castilho pela supervisão e auxílio na execução das técnicas moleculares e ao Ricardo Andrade Zampieri, que sempre esclareceu dúvidas.

Às amigas Marilene Fernandes de Almeida, Sandra Regina Nicoletti D'Auria, Maria Cecília Gibrail de Oliveira Camargo pelo apoio, compreensão e colaboração em todas as etapas e ao Vagner Batista Alves pelo auxílio na preparação de todo material utilizado no campo e laboratório.

À amiga Maria Lúcia de Oliveira pela laboriosa montagem do banco de dados em computador para registro dos dados entomológicos e auxílio na confecção de tabelas e gráficos referentes a estes.

A todos os colegas do Laboratório de Zoonoses e Doenças transmitidas por Vetores que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Emilson Domingos da Silva do Instituto Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz pela doação de kits de ensaio imunoenzimático para leishmaniose canina.

Aos pesquisadores do Instituto Evandro Chagas em Belém - PA, Dr. Adelson de Souza pela doação de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis* e Dra. Edna Ishikawa pela identificação de cepa de protozoário.

Aos moradores do Assentamento Guaicurus pela receptividade, colaboração e confiança. Em especial aos moradores dos lotes 02, 19, 20, 35, 59, 60, 102, 110, 115, 124 pela permissão para instalação de armadilhas para captura de insetos em suas propriedades.

Aos moradores e colaboradores do Assentamento Guaicurus na execução dos trabalhos de campo: Edna Maria da Silva, "Demo", Marilza e Jucilene Granjeiro Dias, Vivaldo Pedro Dias, Antenor Pedro da Silva, Ider e Iver da Silva.

Ao acadêmico de Medicina Veterinária da UNIDERP, Fernando Shiruma, pelos trabalhos de campo com os animais domésticos.

Ao meu amado esposo Júlio César e nossa família pela compreensão, companheirismo, auxílio, apoio e incentivo em todas as etapas do projeto.

A todos da família Renascer em Cristo, em especial a presbítera Eliana, pelas orações, apoio e compreensão.

RESUMO

Savani ESMM. **Aspectos da transmissão de leishmanioses no Assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002-2003. Infecção natural em animais domésticos e vetores.** São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivo. No Estado de Mato Grosso do Sul (MS), como em outros estados brasileiros, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral americana (LVA) apresentam ampla distribuição geográfica. Estudos entomológicos e epidemiológicos realizados no Assentamento Guaicurus, município de Bonito, MS identificaram a presença de vetores de leishmanioses e a ocorrência de casos humanos de LTA e casos de LVA em cães. O presente trabalho, inserido em um projeto mais amplo que dá continuidade a esses estudos, teve por objetivo identificar a infecção natural por *Leishmania* em animais domésticos e vetores e ampliar o conhecimento sobre o comportamento da fauna flebotomínea, em ecossistemas do Assentamento Guaicurus e analisar esses encontros à luz dos fatores ambientais. **Métodos.** Foram examinados 53 eqüinos e 129 cães, dos quais se obtiveram amostras de sangue para a realização da reação de imunofluorescência indireta. As amostras de cães também foram submetidas ao ensaio imunoenzimático. Dos animais reagentes, foram colhidas amostras de aspirado medular para confecção de lâminas, tentativa de isolamento em meio de cultura, inoculação em hamster e realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Nesta última, também foram utilizadas amostras de creme leucocitário destes animais. A fauna flebotomínea foi pesquisada no período de outubro de 2002 a outubro de

2003, realizando-se capturas quinzenais com armadilhas automáticas luminosas dotadas de inseticidas, instaladas em 25 pontos, distribuídos em áreas de mata, de cultivo, peridomiciliares e intradomiciliares e em uma gruta. Para a obtenção de fêmeas a serem dissecadas para a investigação da infecção natural por flagelados, mensalmente, eram feitas capturas com armadilhas de Shannon por dois ou três dias consecutivos, das 18h:00 às 22h:00 em alguns dos peridomicílios e foram instaladas armadilhas automáticas luminosas, sem inseticida, em vários ambientes do Assentamento Guaicurus. As fêmeas dissecadas, após identificação do flebotomíneo e investigação de flagelados sob microscopia, foram mantidas em álcool 70%. Posteriormente, essas fêmeas foram submetidas à PCR para detecção de DNA do parasita e sua identificação por seqüenciamento.

Resultados. Todos os eqüinos pesquisados apresentaram-se não reagentes. Entre os cães foi observado pela reação de imunofluorescência indireta, uma soro-prevalência de 15,5% (20/129) e 31,0% (40/129) pelo ensaio imunoenzimático. Dentre os cães reagentes, foi possível colher nova amostra de sangue de 28 animais e aspirado de medula óssea de 24, sendo encontrados cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Viannia) sp* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Em relação à fauna de flebotomíneos, foram capturados 19538 espécimes pertencentes a 15 espécies. Nas capturas quinzenais com armadilhas automáticas luminosas, com exceção da gruta, único ambiente onde *Lutzomyia longipalpis* não foi capturada e *Lutzomyia almerioi* predominou absolutamente, a primeira teve as suas freqüências mais elevadas em todos os ambientes, em ordem

decrecente, mata, ambiente de cultivo, peridomicílio e intradomicílio, sempre seguida de *Lu. almerioi* e *Nyssomyia whitmani*. *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* apresentaram densidades mais elevadas no verão e em julho e *Lu. almerioi* somente no verão. Entre as 1395 fêmeas dissecadas, foram observadas ao microscópio, três de *Lu. almerioi* infectadas por flagelados. Pools de fêmeas dissecadas de *Lu. almerioi*, *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* foram pesquisados por PCR, com 15 amostras positivas. Detectou-se a presença de DNA das três *Leishmania*, acima descritas em *Lu. longipalpis* e de *Leishmania (L.) chagasi* e de *Leishmania (Viannia) sp* em fêmeas de *Lu. almerioi*. **Conclusões.** A presença de cães e de fêmeas de flebotomíneos infectadas por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) sp*, são indicativos da transmissão de ambas as formas de leishmaniose, LTA e LVA na população canina, no Assentamento Guaicurus. Possivelmente, *Lu. longipalpis* e *Lu. almerioi* atuem como vetoras, sendo o verão o período de maior risco para a transmissão, em virtude das densidades mais elevadas observadas nesta estação.

Descritores: Leishmanioses. Cães. Flebotomíneos. PCR. Sorologia.

SUMMARY

Savani ESMM. **Aspects of leishmaniasis transmission in the Guaicurus Settlement, Bodoquena Planalto, Mato Grosso do Sul State, Brazil, 2002-2003. Natural infection in domestic animals and in sand fly vectors.** São Paulo; 2004. [Doctoral thesis – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objective. In Mato Grosso do Sul State, as in other Brazilian States, American cutaneous leishmaniasis (ACL) and American Visceral leishmaniasis (AVL) are widespread. Entomological and epidemiological studies undertaken in the Guaicurus Settlement, Bonito county, have identified the presence of vectors and human cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis. This present project continuous those studies and has as its objectives the identification of natural infection by *Leishmania* in domestic animals and sand fly vectors, enhancement of our knowledge of the sand fly fauna of the ecosystems of the Guaicurus Settlement and analysis of the epidemiology of these parasite diseases in the light of the factors under investigation. **Methods.** Samples of blood were obtained from horses and dogs for analysis by the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). The dog samples were also submitted to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of the reagent dogs, samples of bone marrow aspirate were obtained for the preparation of slides, isolation in a culture medium, inoculation in hamsters and testing by the polymerase chain reaction (PCR). In this last, samples of the buffy coat of the animals were also used. The phlebotomine fauna was studied during the period from October 2002 to October 2003. Captures were undertaken fortnightly, with

automatic light traps with insecticide in 25 points distributed in forested and cultivated areas, peridomiciliary and intradomiciliary environments and in a cave. Monthly captures were carried out with Shannon traps installed in some of the peridomiciles and automatic light traps, without insecticide, in several environments of the Guaicurus settlement for the investigation of natural infection by flagellates in sand fly females. The dissected females, after examined under the microscope to search for flagellates and identification of the phlebotomine, were conserved in alcohol 70% and submitted to the PCR to detect the presence of parasite DNA and identify it by sequencing. **Results.** None of the horses was reagent. For the dogs observed by IFAT, a seroprevalence of 15.5% (20/129) and 31,0% (40/129) was found by ELISA. Among the reagent dogs, a further sample of blood was taken from 28 animals and bone marrow aspirate from 24 of these, among the dogs some were found to be infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Viannia) sp* and *Leishmania (L.) amazonensis*. As regards the phlebotomine fauna, 19,538 specimens belonging to 15 species were captured. In fortnightly captures with automatic light trap, except in the cave, the only environment in which no *Lutzomyia longipalpis* was captured and *Lutzomyia almerioi* predominated overwhelmingly, the former had higher frequencies in all the environments sampled, in decreasing order: forest, the cultivate areas, peridomicile and intradomicile, always followed by *Lu. almerioi* and *Nyssomyia whitmani*. *Lu. longipalpis* and *Ny. whitmani* present high densities during summer and in July and *Lu. almerioi* only in the summer. Of the 1,395 females dissected, three *Lu. almerioi* were found

under the microscope to be infected by flagellates. Pools of dissected females of *Lu. almerioi*, *Lu. longipalpis* and *Ny. whitmani* were investigated by PCR, presenting 15 positive samples. The presence of the DNA of the three above mentioned *Leishmania* was detected in *Lu. longipalpis* and *Leishmania (L.) chagasi* and *Leishmania (Viannia) sp* in females of *Lu. almerioi*. **Conclusions.** The presence of dogs and phlebotomine females infected by *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (Viannia) sp*, indicates the transmission of both forms of leishmaniasis, ACL and AVL, in the canine population of the Guaicurus Settlement. *Lu. longipalpis* and *Lu. almerioi* possibly, act as vectors, summer being the periods of greatest of risk of transmission, in view of the higher densities presented in that season.

Key-words: Leishmaniasis. Dogs. Phlebotomine. PCR. Serology.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Leishmanioses no Brasil	4
1.3 As leishmanioses em Mato Grosso do Sul.....	9
1.4 Diagnóstico das leishmanioses	16
1.5 Infecção natural por <i>Leishmania</i> nos flebotomíneos	20
1.6 Justificativa	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Descrição da área de estudo.....	26
3.1.1 Aspectos gerais do Planalto da Bodoquena.....	26
3.1.2 Características locais do Assentamento Guaicurus.....	28
3.2 Inquérito de animais domésticos.....	30
3.2.1 População em estudo	30
3.2.2 Colheita de sangue – primeira amostra	31
3.2.3 Colheita de aspirado medular e segunda amostra de sangue	32
3.2.4 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	33
3.2.4.1 Reação de imunofluorescência indireta	33
3.2.4.2 Ensaio imunoenzimático.....	35
3.2.5 Pesquisa parasitológica de <i>Leishmania</i>	36
3.2.6 Detecção molecular de <i>Leishmania</i>	37
3.2.6.1 Extração de DNA	37

3.2.6.2 Reação em cadeia da polimerase.....	39
3.2.6.3 “Nested” – PCR	40
3.2.6.4 Purificação de produto de PCR	41
3.2.6.5 Sequenciamento de DNA	42
3.3 Inquérito sobre flebotomíneos	43
3.3.1 Capturas com armadilhas luminosas, tipo CDC, com inseticida ..	43
3.3.2 Capturas com armadilhas tipo Shannon	47
3.3.3 Capturas com armadilhas luminosas automáticas modificadas, tipo CDC, sem inseticida	49
3.3.4 Investigação de infecção natural por <i>Leishmania</i>	52
3.3.5 Análise dos resultados entomológicos	53
4. RESULTADOS	56
4.1 Inquérito em animais domésticos	56
4.1.1 Inquérito de eqüinos.....	56
4.1.2 Inquérito canino.....	56
4.1.2.1 Prevalência de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	56
4.1.2.2 Investigação dos cães reagentes e inconclusivos	59
4.1.2.2.1 Segunda amostra de soro e eluato sanguíneo	62
4.1.2.2.2 Ocorrência de co-infecção	64
4.1.2.2.3 Análise parasitológica	67
4.1.2.2.4 Análise molecular	67
4.1.2.2.5 Sintomatologia e reatividade dos cães infectados	71
4.2. Inquérito sobre a fauna flebotomínea.....	73
4.2.1 Fauna encontrada	73
4.2.2 Comportamento da fauna	74

4.2.2.1 Densidade	74
4.2.2.2 Diversidade	79
4.2.2.3 Sazonalidade	82
4.2.2.4 Abundância	94
4.2.3 Infecção natural por <i>Leishmania</i>	95
4.2.3.1 Métodos convencionais	95
4.2.3.2 Métodos moleculares	97
5. DISCUSSÃO.....	102
5.1 Inquérito dos animais domésticos	102
5.2 Inquérito sobre a fauna flebotomínea	111
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

ANEXOS

- Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo sobre o protocolo de pesquisa.
- Anexo 2 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (EIE) em amostras de soro e sangue em papel filtro dos cães do Assentamento Guaicurus, fevereiro e março de 2003.
- Anexo 3 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (EIE) na segunda amostra de soro e sangue em papel filtro e manifestações clínicas dos cães do Assentamento Guaicurus, junho de 2003.
- Anexo 4 - Resultados das PCR em aspirado de medula óssea e creme leucocitário e seqüenciamento, em cães do Assentamento Guaicurus, junho de 2003.

- Anexo 5 – Distribuição mensal das chuvas no Município de Bonito-MS, de abril de 2002 a outubro de 2003, e da média mensal do período de 1981 a 2003.
- Anexo 6 - Média de Williams para fêmeas de *Lu. longipalpis* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.
- Anexo 7 - Média de Williams para machos de *Lu. longipalpis* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.
- Anexo 8 - Média de Williams para fêmeas de *Lu. almerioi* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.
- Anexo 9 - Média de Williams para machos de *Lu. almerioi* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.
- Anexo 10 - Média de Williams para fêmeas de *Ny. whitmani* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.
- Anexo 11 - Média de Williams para machos de *Ny. whitmani* por local da captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 - Localização do Assentamento Guaicurus no Planalto da Bodoquena.. 27

Figura 2 - Mapa do Assentamento Guaicurus, Bonito – MS. 29

Figura 3 - Vista frontal do domicílio do lote 20. 44

Figura 4 - Vista lateral de parte do domicílio e anexos do lote 20. 44

Figura 5 - Aspecto do galinheiro existente no peridomicílio do lote 20. 45

Figura 6 - Aspecto da gruta (Gruta do Olímpio) próxima ao lote 56. 46

Figura 7 - CDC com inseticida colocada próxima ao galinheiro do lote 02. 47

Figura 8 - Armadilha de Shannon colocada próximo ao galinheiro do lote 20. 48

Figura 9 - Armadilha automática luminosa com manguito colocada na mata. 50

Figura 10 – Mapa do Assentamento Guaicurus, Bonito - MS com a distribuição dos lotes, assinalados em amarelo, onde ocorreram capturas de flebotomíneos..... 51

Figura 11 - Distribuição dos lotes onde foi pesquisada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em cães, por meio da RIFI, no Assentamento Guaicurus, Bonito – MS. Naqueles assinalados em amarelo, os cães foram não reagentes e em rosa, reagentes.57

Figura 12 - Cão com emagrecimento e crescimento de unhas. 60

Figura 13 - Cão com emagrecimento acentuado e onicogribose. 60

Figura 14 - Cão com alopecia e lesões no tegumento. 61

Figura 15 - Cão assintomático. 61

Figura 16 - Várias amastigotas de *Leishmania* encontradas no esfregaço de aspirado de medula óssea do cão Xebinha (A). Uma forma amastigota e uma tripomastigota no esfregaço de medula óssea (B). Diversas formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* observadas em toda a extensão da lâmina desta amostra (C). 65

Figura 17 - Seqüências de nucleotídeos determinadas para o produto da PCR de DNA da amostra do cão Xebinha, alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, conforme descrito por ULIANA *et al.* (1994), permitindo a identificação dos parasitas deste animal. Produto da PCR com S4 e S12 (1) e “nested”-PCR com S17 e S18 (2) demonstrou infecção por *Trypanosoma evansi* e *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, respectivamente. Os pontos representam bases idênticas a seqüência de *L. (L.) amazonensis* e o til representa a posição de inserções na seqüência de *T. evansi* para alinhar as seqüências das espécies de *Leishmania* com as do *Trypanosoma*. 66

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos **S4** e **S12**. M = marcador molecular *lambda/Hind III*; canaletas de 1 a 5 = DNA de amostras de creme leucocitário ou aspirado de medula óssea dos cães; 6 = DNA de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (controle positivo); 7 = controle negativo sem DNA. 68

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos **S17** e **S18**. M = marcador molecular 1 kb DNA; canaletas de 1 a 22 = DNA de amostras de creme leucocitário ou aspirado de medula óssea dos cães; 23 = DNA de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (controle positivo); 24 = controle negativo sem DNA. 69

Figura 20 - Sequências de nucleotídeos determinadas para o produto da “nested”-PCR de DNA das amostras alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, conforme descrito por ULIANA *et al.* (1994), permitindo a identificação da espécie de *Leishmania*. Cão Pitoco está infectado por *L. (L.) chagasi*, cão Trovão por *L. (L.) amazonensis* e cão Camoio por *L. (Viannia)*. Os pontos representam bases idênticas a seqüência de *L. (L.) amazonensis*. 70

Figura 21 - Total de flebotomíneos capturados, mensalmente, em armadilha CDC com veneno e precipitação mensal no Município de Bonito - MS, novembro/02 a outubro/03. 83

Figura 22 - Média de Williams mensal de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Lu. almerioi*, Assentamento Guaicurus e precipitação mensal no Município de Bonito, novembro/2002 a outubro/2003. 86

Figura 23 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003..... 89

Figura 24 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. almerioi* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003. 91

Figura 25 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Ny. whitmani* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003. 93

RELAÇÃO DAS TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (EIE) nas amostras de soro dos cães.	58
Tabela 2 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático nas amostras de sangue em papel filtro dos cães.	58
Tabela 3 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta entre a primeira e segunda amostras de soro dos 28 cães pesquisados.	62
Tabela 4 – Resultados obtidos entre a primeira e a segunda amostras de sangue em papel filtro por meio da reação de imunofluorescência indireta.	62
Tabela 5 – Resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático entre a primeira e segunda amostras de soro dos 28 cães pesquisados.	63
Tabela 6 – Resultados obtidos entre a primeira e a segunda amostras de sangue em papel filtro por meio do ensaio imunoenzimático.	63
Tabela 7: Resultados das PCR com os pares de oligonucleotídeos S4/S12 e S17/S18 utilizando amostras de DNA extraídas de creme leucocitário e aspirado de medula óssea de cães do Assentamento Guaicurus, município de Bonito, MS.	68
Tabela 8 – Distribuição dos 27 cães com PCR (S17/S18) positiva para <i>Leishmania</i> e destes, os reagentes pela RIFI ou EIE na segunda amostra de soro, segundo os sinais clínicos.....	71
Tabela 9 - Distribuição dos cães reagentes na segunda amostra de soro pela RIFI ou EIE, segundo os sinais clínicos sugestivos de leishmanioses, dentre os 27 cães infectados por <i>Leishmania</i> detectados pela PCR (S17/S18).....	72
Tabela 10 - Distribuição dos cães reagentes na primeira amostra de soro pela RIFI ou EIE, segundo os sinais clínicos sugestivos de leishmanioses, dentre os 27 cães infectados por <i>Leishmania</i> detectados pela PCR (S17/S18).....	72
Tabela 11 - Flebotomíneos capturados em armadilhas de Shannon e CDC com e sem inseticida no Assentamento Guaicurus, outubro de 2002 a outubro de 2003, segundo sexo, espécie e lote de captura.	75
Tabela 12 - Flebotomíneos capturados em armadilhas de Shannon e CDC com e sem inseticida, segundo sexo, espécie e ambiente de captura, Assentamento Guaicurus, outubro/2002 a outubro/2003.	77
Tabela 13 – Flebotomíneos capturados em armadilha automática luminosa com inseticida, segundo os sítios de captura e as espécies, Índice de Diversidade e Média de captura, novembro/02 a outubro/03.	80
Tabela 14 - Média de Williams para as três espécies de flebotomíneos mais freqüentes do Assentamento Guaicurus, segundo os ambientes de captura com armadilhas automáticas luminosas com inseticida, novembro de 2002 a outubro de 2003.	84

Tabela 15 - Média de Williams mensal de <i>Lu. longipalpis</i> , <i>Ny. whitmani</i> e <i>Lu. almerioi</i> no Assentamento Guaicurus, no período de novembro de 2002 a outubro de 2003.	85
Tabela 16 - Média de Williams para machos e fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.	88
Tabela 17 - Média de Williams para machos e fêmeas de <i>Lu. almerioi</i> para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.	90
Tabela 18 - Média de Williams para machos e fêmeas de <i>Ny. whitmani</i> para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.	92
Tabela 19 - Índice de Abundância da Espécie Padronizado (IAEP) dos flebotomíneos capturados em CDC com veneno, Assentamento Guaicurus, novembro/02 a outubro/03.	94
Tabela 20 – Número de fêmeas de flebotomíneos dissecadas e infectadas por flagelados, conforme observação microscópica, segundo espécie e o lote de captura, Assentamento Guaicurus, outubro/02 a outubro/03.	96
Tabela 21 - Número de fêmeas dissecadas e encontradas infectadas pela PCR com oligonucleotídeos S17 e S18, segundo local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.	98
Tabela 22 – Taxas de infecção natural por <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos pesquisadas por meio da PCR com oligonucleotídeos S17 e S18, segundo local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.....	99
Tabela 23 – Taxas de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos pesquisadas por meio da PCR com oligonucleotídeos S17/S18, conforme a espécie de <i>Leishmania</i> e local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.....	100

ABREVIATURAS

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EIE: Ensaio Imunoenzimático

FSP/USP: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

G6PD: Glicose – 6 – fosfato dehidrogenase

IAEP: Índice de Abundância de Espécies Padronizado

ICB/USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

INCRA: Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária

LabZoo-VIS: Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores da
Vigilância em Saúde da Prefeitura do Município de São Paulo

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

MS: Estado de Mato Grosso do Sul

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA: DNA ribossômico

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

SSU: Subunidade menor do ribossomo (18S)

TE: Tris - EDTA

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

UNIDERP: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do
Pantanal

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As leishmanioses são zoonoses conseqüentes do parasitismo por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, em hospedeiros vertebrados (DEDET 1993).

São reconhecidas cerca de 25 espécies de *Leishmania* que podem causar a doença no homem (LAINSON e SHAW 1987; JACOBSON 2003). Embora, morfológicamente muito parecidas, produzem distintas patologias (ASHFORD 2000), cuja feição comum a todas, é a cronicidade da doença. A infecção pode ser predominantemente visceral, restrita à pele ou disseminar-se para as mucosas, causando a leishmaniose cutâneo-mucosa (ROSE *et al.* 2004).

Amplamente distribuída no mundo, inside de forma endêmica em 88 países, distribuídos nos cinco continentes, África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul (JACOBSON 2003). Na Oceania, considerada livre da endemia (HERWALDT 1999; HANDMAN 2001), constatou-se, recentemente, a ocorrência da leishmaniose cutânea em cangurus vermelhos da Austrália (ROSE *et al.* 2004).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde - OMS (1990), cerca de 350 milhões de pessoas no mundo estão sob o risco de adquirir a doença, existem, aproximadamente, 12 milhões de infectados e cerca de 1,5 milhão de novos casos são registrados a cada ano. O Brasil

encontra-se entre os cinco países do mundo que respondem por cerca de 90% dos casos de leishmaniose nas formas visceral e tegumentar.

As espécies do gênero *Leishmania* circulam em ampla variedade de mamíferos silvestres e menos freqüentemente, em animais domésticos.

Na América, os reservatórios são mamíferos silvestres ou domésticos pertencentes às ordens Marsupialia, Xenarthra, Primatas não humanos, Carnivora, Perissodactyla e Rodentia (DEDET 1993), nos quais se alimentam os vetores.

Os vetores são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo conhecidas, nas Américas, cerca de 470 espécies, das quais, aproximadamente, 60 estão envolvidas na transmissão das leishmanioses (KILLICK-KENDRICK 1990; DEDET 1993; SANTOS *et al.* 1998; GALATI *et al.* 2003b). Dessas espécies, algumas são vetores comprovados, ou seja, apresentam distribuição geográfica coincidente com a da doença, alta densidade, demonstração de que se infectam e transmitem experimentalmente o parasita que causa a doença no homem, são antropofílicas e apresentam estreito grau de relacionamento com os reservatórios na natureza (KILLICK-KENDRICK 1990), outras por evidências epidemiológicas, acrescidas ou não da identificação da infecção natural pelos parasitas (DEDET 1993).

Os flebotomíneos têm seus criadouros em solo úmido e rico em matéria orgânica, entre ou embaixo de rochas, entre raízes e folhas caídas e em tocas de animais, geralmente ao abrigo da incidência direta da luz solar. Estes microhabitats, bem como tronco de árvores e arbustos, são utilizados

como locais de repouso para os adultos. Somente as fêmeas são hematófagas (FORATTINI 1973).

A maior diversidade das espécies de flebotomíneos encontra-se nas florestas tropicais, mas também estão presentes em ambientes modificados pelo homem, tais como áreas de cultivo e urbanizadas. Os adultos afastam-se pouco dos locais de abrigo, geralmente, até 200 metros (YOUNG e DUNCAN 1994).

Na América, o protozoário associado à leishmaniose visceral é *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e nas formas dermatrópicas, diversas espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (THOMAZ-SOCCOL *et al.* 1993).

No continente americano, as leishmanioses estão presentes em 21 países (DEDET 1993).

Casos autóctones de leishmaniose visceral americana (LVA) têm sido assinalados no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Suriname, Estados Unidos e nas ilhas de Guadalupe e Martinica (DEDET 1993; GRIMALDI e TESH 1993).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre na maioria dos países da América, com exceção do Canadá, algumas ilhas do Caribe, Chile e Uruguai (GRIMALDI e TESH 1993; YOUNG e DUNCAN 1994).

1.2 Leishmanioses no Brasil

No Brasil, as leishmanioses têm grande relevância na Saúde Pública, em virtude da larga distribuição geográfica e severidade das manifestações clínicas. Nos últimos anos, essa importância vem crescendo devido ao aumento das incidências, ocorrência de algumas formas da doença em novas áreas geográficas e tendências à urbanização. Enfatiza-se também as dificuldades no diagnóstico, tratamento e controle, a complexidade dos quadros epidemiológicos e a variedade de ambientes em que ocorrem (GOMES 1992, 1994; MARZOCHI 1992; MARZOCHI e MARZOCHI 1994; GOMES *et al.* 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002a).

A leishmaniose visceral americana tem ocorrido em todos os estados da Região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país, além dos Estados do Pará, Tocantins e Roraima, sendo que o território brasileiro contribui com mais de 90% dos casos humanos que ocorrem nas Américas (GRIMALDI *et al.* 1987; DEDET 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002a).

Na epidemiologia desta zoonose, o cão (*Canis familiaris*) exerce importante papel como reservatório doméstico de *Leishmania (L.) chagasi* (DEANE 1956; ARIAS *et al.* 1996; GOMES *et al.* 1996), enquanto canídeos silvestres, como as raposas *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*, representam reservatórios primários do parasita (DEANE 1956; DEDET 1993). Didelfídeos, na Colômbia, têm sido apontados como importantes reservatórios (TRAVI *et al.* 1994), no Brasil, a infecção foi identificada em *Didelphis albiventris* (SHERLOCK *et al.* 1984) e na Venezuela em *Didelphis*

marsupialis (ZULUETA *et al.* 1999). A possibilidade de outros animais, como os eqüinos, atuarem como reservatórios domésticos do parasita tem sido investigada (CERQUEIRA *et al.* 1999).

O vetor incriminado na maioria das áreas de transmissão de LVA tem sido *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (DEDET 1993; SHERLOCK 1994; FERRO *et al.* 1995). Todavia, nos municípios brasileiros de Ladário e Corumbá no Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia* (*L.*) *cruzi* parece exercer este papel (GALATI *et al.* 1997; SANTOS *et al.* 1998), assim como *Pintomyia* (*Pifanomyia*) *evansi*, em um foco, na Colômbia (TRAVI *et al.* 1996).

No passado, a LVA ocorria basicamente em área rural com transmissão doméstica ou peridoméstica. Após a década de 70, tem-se observado uma crescente urbanização ou uma crescente “ruralização” da periferia de áreas urbanas. Assim, a transmissão tem ocorrido em cidades do interior e em capitais de estados da Região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país como Natal, São Luís, Belo Horizonte, Rio de Janeiro e Campo Grande (NUNES *et al.* 1988; MARZOCHI *et al.* 1994; SHERLOCK 1994; CUNHA *et al.* 1995; GOMES *et al.* 1996; SILVA *et al.* 1997; SANTOS *et al.* 1998; GALIMBERTTI *et al.* 1999; TOLEZANO *et al.* 1999; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.* 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002a).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) atinge todos os estados do território nacional (COUTINHO *et al.* 1981; MARZOCHI 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002b) e com maior freqüência, causam a infecção no homem, as espécies *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*,

Leishmania (Viannia) guyanensis e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GOMES 1992; LAINSON *et al.* 1994).

Os principais vetores pertencem aos subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus* do gênero *Lutzomyia* (DEDET 1993), que segundo GALATI (1995) são representantes dos gêneros *Bichromomyia*, *Nyssomyia* e *Psychodopygus*.

As espécies do protozoário apresentam diferente distribuição geográfica no território brasileiro. *Leishmania (L.) amazonensis* encontra-se nos Estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Paraná e Santa Catarina, *Leishmania (V.) guyanensis* nos Estados do Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará e Roraima, enquanto que *Leishmania (V.) braziliensis* apresenta distribuição mais ampla, abrangendo os Estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Maranhão, Bahia, Ceará, Paraíba, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (GRIMALDI *et al.* 1987; SILVEIRA *et al.* 1990; MARZOCHI 1992; DEDET 1993; LAINSON *et al.* 1994; TOLEZANO 1994, 2000; NUNES *et al.* 1995; DIAS *et al.* 1997; GRISARD *et al.* 2000).

Casos humanos de LTA associados a outras espécies de *Leishmania*, têm sido relatados, como *Leishmania (V.) naiffi* nos Estados do Pará e Amazonas, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi* e, a recentemente descrita, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, no Estado do Pará (SILVEIRA *et al.* 1987, 2002; LAINSON *et al.* 1990; SHAW *et al.* 1991).

Leishmania (V.) guyanensis, associada à floresta primitiva, é transmitida, principalmente, pelo vetor *Nyssomyia umbratilis* e tem os edentados *Choloepus didactylus* e *Tamandua tetradactyla* como reservatórios comprovados (GOMES 1992; GRIMALDI e TESH 1993; LAINSON *et al.* 1994).

Leishmania (L.) amazonensis é o agente associado aos casos de leishmaniose cutâneo-difusa, forma da doença de mais difícil cura ou incurável. O principal vetor é *Bichromomyia flaviscutellata* e tem como principais reservatórios os roedores *Proechimys guyanensis* e *Oryzomys* sp, ocorrendo em ambientes de floresta úmida, várzeas e margens de rios (GOMES 1992; GRIMALDI e TESH 1993; LAINSON *et al.* 1994).

O ciclo epidemiológico de *Leishmania (V.) braziliensis* - espécie responsável pelos casos mucocutâneos - fora da região norte do país, permanece ainda não esclarecido, existindo várias espécies de flebotomíneos incriminados e os reservatórios silvestres não foram determinados de forma definitiva. Porém, esse parasita já foi observado em diversos animais domésticos, como cães (HERRER e CHRISTENSEN 1976; DIAS *et al.* 1977; ARAUJO FILHO *et al.* 1981b; MARZOCHI *et al.* 1982; AGUILAR *et al.* 1984, 1989; BARRETTO *et al.* 1984; COUTINHO *et al.* 1985; FALQUETO *et al.* 1986; PIRMEZ *et al.* 1988; ROSA *et al.* 1988; GOMES *et al.* 1990; YOSHIDA *et al.* 1990; LONARDONI *et al.* 1993; VASCONCELOS *et al.* 1994; MADEIRA *et al.* 2003), eqüinos (AGUILAR *et al.* 1989; YOSHIDA *et al.* 1990; BARBOSA-SANTOS *et al.* 1994), asnos (AGUILAR *et al.* 1984; ROSA *et al.* 1988) e roedores sinantrópicos

(ARAUJO FILHO *et al.* 1981a; MAGALHÃES ROCHA *et al.* 1988; PETERSON *et al.* 1988). Inclusive o homem tem sido considerado como fonte de infecção para o vetor (MARZOCHI 1992). Recentemente, foram encontrados infectados pela *Leishmania (V.) braziliensis*, no Estado de São Paulo, duas espécies de roedores silvestres, *Oxymycterus quaestor* e *Bollomys lasiurus* (TOLEZANO 2000) e, em Pernambuco, esta última espécie, assim como o roedor sinantrópico, *Rattus rattus* (BRANDÃO-FILHO *et al.* 2003).

A infecção humana, no passado, estava relacionada com a penetração do homem em ambientes florestais primitivos - onde ocorre o ciclo silvestre do parasita - para derrubada de matas, abertura de estradas e implantação de povoados em áreas pioneiras, sendo que os indivíduos acometidos eram, basicamente, adultos do sexo masculino (GOMES *et al.* 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994).

Atualmente, além desse padrão de transmissão da LTA, observa-se que nas áreas de colonização antiga, com grande devastação das matas, os focos de leishmaniose estão restritos a alguns resíduos da cobertura vegetal primitiva (GOMES 1992; TOLEZANO 1994).

Esses resíduos, em franco processo de degradação, obrigam as populações de reservatórios silvestres a procurarem o ambiente extraflorestal (peridomiciliar e domiciliar) em busca de alimentos. Processo semelhante ocorre com os vetores, que buscam no homem e animais domésticos a fonte alimentar para sobrevivência (GOMES 1992).

Assim, parece que as espécies de *Leishmania* estão se adaptando a ambientes alterados, principalmente, a *L. (V.) braziliensis*, que vem apresentando características sinantrópicas, levando à infecção do homem em seu domicílio, atingindo indistintamente, ambos os sexos e faixas etárias, a exemplo do que ocorre nas áreas florestais remanescentes da mata Atlântica da Região Sudeste, nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, onde *Nyssomyia intermedia* s. lat. representa o principal vetor (RANGEL *et al.* 1984; GOMES 1992, 1994; MARZOCHI e MARZOCHI 1994).

1.3 As leishmanioses em Mato Grosso do Sul

Casos humanos autóctones de leishmaniose tegumentar americana têm sido notificados desde 1983 em Mato Grosso do Sul (MS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002b).

A penetração do homem em ambiente silvestre, para implantação de projetos agropecuários, aberturas de estradas e assentamentos de trabalhadores rurais sem terra, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como já observado em outras regiões do Brasil (PESSÔA e BARRETO 1948; BARBOSA *et al.* 1965; PESSOA e MARTINS 1982; NASCIMENTO 1986) tem propiciado o surgimento de casos da doença.

A LTA tem sido registrada em 72 dos 77 municípios, acometendo mais os indivíduos do sexo masculino e faixa etária acima de 15 anos,

ocorrendo transmissão em ambiente rural (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b).

Estudos epidemiológicos sobre esta zoonose em MS são escassos, até o momento, apesar da ampla dispersão e do crescente número de casos da doença.

NUNES *et al.* (1995) em pesquisa realizada no período de 1991 a 1994, encontraram 32 pessoas reagentes à intradermoreação de Montenegro e 8 casos de doença em atividade dentre 150 moradores de Boa Sorte, Município de Corguinho. Sete pacientes apresentaram a forma cutânea e um a forma mucosa, com destruição de septo nasal. As lesões ativas e ou cicatriciais localizavam-se, mais em áreas descobertas do corpo.

Os casos ocorreram em adultos acima de 20 anos, de ambos os sexos, predominantemente nos homens. Os pacientes executavam atividades de desmatamentos nas matas ciliares e cerrados, onde também, caçavam durante as primeiras horas da noite. As mulheres acometidas realizavam atividades domésticas ao entardecer, como lavar roupa em córrego circundado por mata nativa ou cortar lenha em área de cerrado.

Esses fatos, associados ao insignificante número de flebotomíneos capturados no interior do domicílio (GALATI *et al.* 1996) e ao não encontro de animais domésticos infectados (NUNES *et al.* 1994), sugeriram que a transmissão da parasitose ocorreu em ambiente extradomiciliar.

Nyssomyia whitmani (ANTUNES e COUTINHO 1939) foi a espécie de flebotomíneo dominante entre as 26 espécies assinaladas nos diferentes ambientes estudados da fazenda Boa Sorte. Esta espécie foi indicada como

vetora de leishmaniose tegumentar naquela região, devido ao seu grau de antropofilia, atividade predominante entre 17 e 21 horas, e o encontro de um espécime com flagelados no intestino posterior e médio, em uma área em que o parasita foi identificado como *L. (V.) braziliensis* (GALATI *et al.* 1996).

Em trabalho desenvolvido junto ao Assentamento Guaicurus, município de Bonito, NUNES (2001), constatou que, entre janeiro de 1998 a dezembro de 1999, foram notificados sete casos de LTA em moradores do Assentamento e um caso em índio Kadwéo residente em uma área adjacente conhecida como Campo dos Índios, no município de Porto Murtinho.

Todos os pacientes tiveram a forma cutânea da parasitose, com úlceras únicas ou múltiplas. O parasita foi identificado como *L. (V.) braziliensis*.

A observação de que todos os casos ocorreram em adultos do sexo masculino, que trabalhavam em matas ou caçavam à noite em área de cerrado, onde *Ny. whitmani* foi a espécie de flebotomíneo predominante (Galati, 2000), aliada ao não encontro de LTA em mulheres, crianças e animais domésticos, sugeriu que a transmissão não ocorreu no domicílio ou peridomicílio (NUNES 2001).

Portanto, a transmissão de LTA, tanto em Boa Sorte, município de Corguinho, centro de MS, como no Assentamento Guaicurus, município de Bonito, sudoeste do Estado pôde ser enquadrada no padrão epidemiológico de doença ocupacional, em que aos determinantes biológicos se somaram e

interagiram os ecológicos, os econômicos, os sociais e os culturais (NUNES *et al.* 1994; NUNES, 2001).

Em relação à leishmaniose visceral, sua presença no Estado é relatada desde o início do século XX, visto que, o primeiro caso humano autóctone do continente americano, diagnosticado em 1913, em Assunção, no Paraguai, era procedente de Porto Esperança, município de Corumbá, MS (MIGONE 1913; DEANE 1956).

Foram registrados, ainda, casos esporádicos da doença em zona rural de outros municípios, no transcorrer do século (CHAGAS e CHAGAS 1938; OLIVEIRA, 1938; ARRUDA *et al.* 1949).

A partir de 1980, notificações de casos humanos, diagnosticados clinicamente, no Município de Corumbá e a observação de cães com aspectos sugestivos de leishmaniose visceral nas ruas da cidade, levaram a estudos para esclarecer componentes epidemiológicos da parasitose nesta área.

Em inquérito sorológico realizado na população canina de Corumbá, em 1983, encontrou-se 8,7% de reagentes dentre 481 animais examinados. Os parasitas isolados de cães foram identificados bioquimicamente como *L. (L.) chagasi* (NUNES *et al.* 1988; YAMAMOTO *et al.* 1988).

Outros inquéritos sorológicos demonstraram, ainda, alta taxa de infecção na população canina (24%) dos municípios de Corumbá e de Ladário (SANTOS *et al.* 1998), considerados hiperendêmicos para a parasitose (GOMES *et al.* 1996).

Nos últimos anos, observou-se a expansão da leishmaniose visceral para outros municípios do Estado: Água Clara, Anastácio, Antônio João, Aquidauana, Bela Vista, Bodoquena, Bonito, Brasilândia, Costa Rica, Coxim, Dois Irmãos do Buriti, Guia Lopes da Laguna, Jardim, Juty, Miranda, Nioaque, Paranaíba, Ribas do Rio Pardo, Rio Verde, Sidrolândia, Terenos, Três Lagoas e Campo Grande (NUNES 2001; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MATO GROSSO DO SUL 2002a).

A fauna flebotomínea pesquisada em área urbana e na periferia de Corumbá, no período de 1984 a 1986, foi composta por *Brumptomyia brumpti* (Larrouse, 1920), *Evandromyia (Barrettomyia) corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego Jr., 1989), *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938), *Lutzomyia (Lutzomyia) forattinii* Galati, Rego Jr., Nunes & Teruya, 1985, *Martinsmyia oliveirai* (Martins, Silva & Falcão, 1970), *Micropygomyia (Sauromyia) peresi* (Mangabeira, 1942), *Evandromyia (Barrettomyia) sallesi* (Galvão & Coutinho, 1940) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Pont, 1927) (GALATI *et al.* 1985; GALATI *et al.* 1989; GALATI *et al.* 1997).

A ausência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) nas capturas e a predominância de *Lu. cruzi*, no peri e no intradomicílio, indicaram a possibilidade desta espécie atuar como vetora de LVA em Corumbá (GALATI *et al.* 1997). Posteriormente, foram encontrados espécimes com promastigotas restritas à porção anterior do tubo digestivo, sendo o parasita identificado como *L. (L.) chagasi*, por meio de anticorpos monoclonais (SANTOS *et al.* 1998). Esses encontros, associados aos dados epidemiológicos (GALATI *et al.* 1997), apontaram *Lu. cruzi* como principal

vetor de LVA nos municípios de Corumbá e de Ladário (SANTOS *et al.* 1998).

Existe a possibilidade de que *Lu. forattinii*, também, participe do ciclo de transmissão da doença, na área rural e na periferia do município de Corumbá, visto a sua expressiva densidade em ecótopo natural, localizado nas imediações da cidade e a sua ocorrência em explosões simultâneas com as de *Lu. cruzi*, com invasão de domicílio. Soma-se a isto, o fato de ser antropofílica e pertencer ao mesmo grupo monofilético de *Lu. longipalpis* e de *Lu. cruzi* (GALATI *et al.* 1997; NUNES 2001).

Recentemente, foi assinalada a presença de *Lu. longipalpis* em um foco de leishmaniose visceral em Corumbá, apresentando assim, uma nova variável na epidemiologia da doença naquele município (SANTOS *et al.* 2003).

Em municípios do Estado, como Miranda tem sido encontrada somente *Lu. longipalpis*, enquanto que em outros como Anastácio, Aquidauana e Campo Grande são relatadas a presença tanto de *Lu. longipalpis* como de *Lu. cruzi* (OLIVEIRA 2000; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO MATO GROSSO DO SUL 2002b). Deste modo, torna-se importante a realização de mais pesquisas visando determinar o significado epidemiológico desses encontros.

Em 1999, foi realizado inquérito sorológico na população canina do Assentamento Guaicurus, Município de Bonito, observando-se 23,7% de reagentes dentre os 97 cães examinados. Os parasitas isolados foram

identificados por anticorpos monoclonais como *L. (L.) chagasi*. Não foram notificados casos humanos de LVA no Assentamento (NUNES 2001).

Neste estudo foram encontradas 13 espécies de flebotomíneos, entre elas *Lu. longipalpis*, que foi a espécie mais freqüente e presente em quase todos os ambientes estudados sendo mais expressiva em pocilga, em abrigo de ovinos, galinheiro e no domicílio (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b), podendo ser suspeita pela transmissão de leishmaniose visceral entre os cães do Assentamento Guaicurus.

Foram dissecadas 230 fêmeas de flebotomíneos, capturadas com armadilha luminosa, Shannon e aspiração em iscas animais, para identificação de infecção natural pelos métodos clássicos e não foram encontrados espécimes com flagelados (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b).

Dentre a fauna flebotomínea do Guaicurus, a alta densidade populacional de *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* Galati & Nunes, 1999, espécie descrita a partir de estudos na Serra da Bodoquena, mereceu destaque por fazer parte do mesmo grupo monofilético de *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* (GALATI *et al.* 1997). Soma-se o fato de que *Lu. almerioi* apresentou freqüência alta em cavernas da Província Espeleológica da Bodoquena (GALATI *et al.* 2003a), onde existem mamíferos, que podem atuar como reservatórios silvestres de leishmanioses na região (COSTA e SECOND 1992).

1.4 Diagnóstico das leishmanioses

No diagnóstico das leishmanioses devem ser considerados os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

Em relação ao diagnóstico laboratorial, atualmente no Brasil, as técnicas parasitológicas e imunológicas são as mais utilizadas nos programas de controle das leishmanioses (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE 1997).

Os métodos parasitológicos usados para confirmação de caso fundamentam-se na pesquisa do parasita, em material biológico adequado à suspeita clínica (biópsia de borda de lesão cutânea e/ou aspirado de medula óssea, baço ou linfonodo), por meio de esfregaço em lâmina corado pelo método de Giemsa, inoculação em hamster e cultura *in vitro* (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE 1997; HERWALDT 1999). Quando formas promastigotas do parasita são isoladas no meio de cultura, pode-se identificar a espécie de *Leishmania* por meio da reação de imunofluorescência com anticorpos monoclonais (SHAW *et al.* 1989).

As técnicas parasitológicas podem apresentar sensibilidade menor que 80%, que ainda pode diminuir devido a dificuldades com contaminação da cultura e a manutenção de hamsters por períodos de 6 meses ou mais. A detecção do protozoário ao exame microscópico depende da presença de muitos parasitas no material pesquisado e necessita de pessoal técnico treinado e com experiência neste diagnóstico (LOPEZ *et al.* 1993; ASHFORD *et al.* 1995).

As técnicas imunológicas envolvem provas sorológicas para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e testes cutâneos, a fim de detectar resposta imune celular (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994; HERWALDT 1999). Testes sorológicos e intradérmicos não são muito conclusivos, pois podem ocorrer reações cruzadas ou falsos-negativos (MANSON-BAHR 1987).

Os métodos sorológicos são mais úteis para detectar anticorpos na leishmaniose visceral, pois os níveis de anticorpos circulantes nesta zoonose são, significativamente superiores, aos níveis encontrados na leishmaniose tegumentar (DUXBURY e SADUN 1964; BRAY e LAINSON 1965; WALTON *et al.* 1972; MENDONÇA *et al.* 1988).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é um método sorológico, muito utilizado em estudos sobre leishmanioses envolvendo população humana ou canina (MARZOCHI *et al.* 1980; IVERSSON *et al.* 1983; LEOPOLDO e SILVA *et al.* 1984; COUTINHO *et al.* 1985; NUNES *et al.* 1988; PIRMEZ *et al.* 1988; GOMES *et al.* 1990; SAN MARTIN-SAVANI 1998) e pode auxiliar no diagnóstico laboratorial das leishmanioses, sobretudo em casos nos quais não é possível encontrar o protozoário (BITTENCOURT *et al.* 1968; CHIARI *et al.* 1973; MENDONÇA *et al.* 1988).

A reação de imunofluorescência indireta é grupo-específica, portanto, reações cruzadas entre leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar e doença de Chagas podem ocorrer (BRAY e LAINSON 1965; ARAUJO e MAYRINK 1968; FURTADO 1980) e em menor número, com portadores de malária, esquistossomose e lepra (DUXBURY e SADUN 1964). No entanto,

os títulos de anticorpos são maiores com antígenos homólogos do que com os heterólogos (BRAY e LAINSON 1965; CAMARGO e REBONATO 1969).

As reações cruzadas podem ser diminuídas, aumentando-se as diluições dos soros testados (ARAUJO e MAYRINK 1968; FURTADO 1980). Deste modo, somente títulos iguais ou superiores a 40 podem ser considerados indicativos da infecção (COUTINHO *et al.* 1985), visto que aquelas podem ocorrer com maior frequência em títulos menores que esse (LEOPOLDO e SILVA *et al.* 1984).

A RIFI tem sido a técnica mais empregada em áreas endêmicas de LVA, em inquéritos sobre populações caninas, principalmente para identificar cães infectados que não apresentam sintomas, visando o controle desta zoonose (BADARÓ *et al.* 1983; MANCIANTI *et al.* 1986; BADARÓ 1987; BRAGA *et al.* 1998).

Para a realização da RIFI em inquéritos caninos, utilizam-se, em geral, amostras de sangue colhidas em papel de filtro pela facilidade da coleta e armazenagem no campo e envio ao laboratório (SOUZA e CAMARGO 1966; GUIMARÃES *et al.* 1986; EVANS *et al.* 1990; ZICKER *et al.* 1990; MACHADO-COELHO *et al.* 1995; BRAGA *et al.* 1998).

O ensaio imunoenzimático (EIE), em geral, apresenta maior sensibilidade do que a RIFI, possibilita o processamento de um grande número de amostras em curto intervalo de tempo e pode propiciar a possibilidade de uso em condições de campo (EVANS *et al.* 1990; ASHFORD *et al.* 1993; PARANHOS-SILVA *et al.* 1996; BARBOSA-DE-DEUS *et al.* 2002).

O emprego do EIE em amostras de soro de cães tem demonstrado alta sensibilidade em detectar os animais infectados, sendo que sua sensibilidade e especificidade são influenciadas pelo antígeno utilizado na reação (QUINNELL *et al.* 2001; SINGH e SIVAKUMAR 2003).

O uso de técnicas moleculares para o diagnóstico permite alta sensibilidade e especificidade, além da detecção - possível a partir de um único parasita na amostra - e caracterização mais rápida do parasita (LOPEZ *et al.* 1993; ASHFORD *et al.* 1995; SINGH e SIVAKUMAR 2003).

A sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) dependem de vários fatores como protocolo de extração do DNA, os pares de oligonucleotídeos, a amostra que será utilizada, pois pode conter inibidores da enzima *Taq*-polimerase (REITHINGER *et al.* 2002).

A PCR tem demonstrado ser uma técnica sensível para detectar infecção canina na leishmaniose tegumentar (REITHINGER *et al.* 2000) e na leishmaniose visceral (QUINNELL *et al.* 2001; SILVA *et al.* 2001).

Entre as várias seqüências alvo empregadas na PCR para *Leishmania*, utiliza-se uma região do DNA ribossômico (rDNA) que codifica a subunidade menor do ribossomo (SSU). Esta região está presente em grande número de cópias nos organismos e inclui regiões conservadas e variáveis, que permitem identificar tanto o gênero *Leishmania* quanto os subgêneros deste parasita (ULIANA *et al.* 1994).

Regiões conservadas do gene G6PD, presente em cópia única no genoma de *Leishmania* e que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, têm sido utilizadas como seqüências alvo em PCR's para

detectar DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e discriminar, pelo emprego de diferentes oligonucleotídeos, *Leishmania (Viannia) braziliensis* das demais espécies pertencentes ao mesmo subgênero (CASTILHO *et al.* 2003).

1.5 Infecção natural por *Leishmania* nos flebotomíneos

Nos flebotomíneos o encontro de infecção natural por protozoários do gênero *Leishmania* é imperativo para identificar possíveis espécies vetoras em determinada área endêmica, bem como suas taxas de infecção.

Os métodos mais usuais para se estimar a infecção natural dos vetores têm sido a dissecação das fêmeas para observação de seu conteúdo intestinal e tentativa de isolamento em meio de cultura.

A observação ao microscópio não é exata, visto que podem ocorrer outros protozoários flagelados nestes insetos, indistinguíveis morfológicamente. A cultura frequentemente contamina, não permitindo o isolamento do parasita e sua posterior identificação (MICHALSKY *et al.* 2002).

As técnicas moleculares com maior sensibilidade e especificidade têm se demonstrado úteis para estudos epidemiológicos, que visam determinar a infecção natural por *Leishmania* em populações de flebotomíneos e identificar possíveis vetores em áreas endêmicas (PEREZ *et al.* 1994; RODRIGUEZ *et al.* 1999; SILVA e GRUNEWALD 1999; ARANSAY *et al.* 2000; MICHALSKY *et al.* 2002).

1.6 Justificativa

Em decorrência dos aspectos abaixo arrolados:

- a gravidade das manifestações clínicas da LVA (BADARÓ *et al.* 1986; MONTEIRO *et al.* 1994);
- a LVA ter adquirido, na atualidade, nova dimensão como grave infecção oportunista, quando associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (FERREIRA 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA 1997; BORGES *et al.* 1999; FERREIRA *et al.* 2001, SILVA *et al.* 2002);
- a presença de LVA no Mato Grosso do Sul, desde a década de 80 do século passado (NUNES *et al.* 1988) em Corumbá e Ladário, e sua expansão nos últimos anos para muitos outros municípios, inclusive para Campo Grande, a capital do Estado (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MATO GROSSO DO SUL 2002a);
- a necessidade de diagnóstico precoce e tratamento específico para a prevenção da morte por LVA, particularmente entre os mais pobres, contingente que inclui a maioria das vítimas da parasitose (GOMES *et al.* 2001);
- a demonstração de que além dos cães outros reservatórios, tais como: pessoas, raposas e marsupiais, podem infectar o vetor de LVA (DEANE 1956; SHERLOCK *et al.* 1984; TRAVI *et al.* 1994; ARIAS *et al.* 1996; ZULUETA *et al.* 1999; COSTA *et al.* 2000);

- a necessidade de inquéritos sorológicos amostrais de infecção canina e a intensificação da identificação de vetores em áreas de ocorrência de LVA (GOMES *et al.* 2001);
- a prioridade para o controle de vetores, na estratégia atual do Ministério da Saúde para o combate da LVA no Brasil (GOMES *et al.* 2001);
- a necessidade de pesquisas sobre a epidemiologia da LVA, que não está, ainda, devidamente esclarecida, para que as recomendações para o controle sejam adequadas às peculiaridades regionais (GOMES *et al.* 2001);
- a ampla distribuição da LTA no Mato Grosso do Sul, 72 dos 77 municípios (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b) e a ocorrência de formas clínicas graves em pacientes oriundos de diversas regiões (MENEZES *et al.* 1986; NUNES *et al.* 1995);
- a necessidade em áreas de ocorrência de LTA, de estudos sobre sua estrutura epidemiológica, seus aspectos clínicos, etiológicos e ecológicos, para determinação dos fatores envolvidos no comportamento da prevalência da infecção humana (LAINSON e SHAW 1970, 1987; FORATTINI *et al.* 1972, 1973; MAGALHÃES ROCHA *et al.* 1988; PETERSON *et al.* 1988; GOMES 1992; VASCONCELOS *et al.* 1994);
- a ocorrência de *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), o vetor da leishmaniose cutâneo-difusa, na Serra da Bodoquena (NUNES 2001);
- a implementação do ecoturismo para a região sudoeste de MS, principalmente, para as áreas de cavernas e de rios que cortam o Planalto da Bodoquena (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003a);

- a alta taxa de migração em MS, com ênfase para a intensificação dos assentamentos de trabalhadores rurais sem terra na região sudoeste do Estado;
- a ocorrência da leishmaniose visceral canina no Assentamento Guaicurus, do INCRA, município de Bonito, MS (NUNES 2001);
- a ocorrência de casos de LTA em moradores do Assentamento Guaicurus e de áreas adjacentes,

são urgentes os estudos sobre a relação **parasita (s) - vetor (es) - homem - reservatório(s)**, para identificar os fatores que contribuem para a transmissão das leishmanioses em áreas do sudoeste do Estado de Mato Grosso Sul, de modo a fornecer subsídios aos responsáveis pelas ações de saúde local para uma política de intervenção, visando o controle das leishmanioses, baseados no conhecimento dos componentes bio-ecológicos das diversas populações envolvidas nessas parasitoses e também alertar os órgãos locais responsáveis pelo turismo e assentamentos de trabalhadores rurais sem terra, sobre os possíveis riscos de transmissão de leishmanioses no sudoeste sul-matogrossense.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar a taxa de infecção por protozoários do gênero *Leishmania* em populações de animais domésticos e de vetores e ampliar o conhecimento sobre o comportamento da fauna flebotomínea, em ecossistemas do Assentamento Guaicurus, município de Bonito - Estado do Mato Grosso do Sul, no período de outubro de 2002 a outubro de 2003 e analisar esses encontros à luz dos fatores ambientais.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a fauna flebotomínea associada a ecossistemas, tais como: gruta, mata e ambiente antrópico.
- Observar a diversidade, índice de abundância e sazonalidade para as espécies de flebotomíneos da área.
- Verificar a distribuição espacial dos flebotomíneos no Assentamento Guaicurus.
- Investigar infecção natural por leishmânias, em fêmeas de flebotomíneos capturadas em ambientes antrópicos e silvestres, por meio de técnicas parasitológicas e moleculares.
- Identificar possíveis espécies vetoras de LTA ou LVA no Assentamento Guaicurus.

- Comparar as taxas de infecção natural por leishmânias nos flebotomíneos encontrados no domicílio, peridomicílio, mata e cavernas.
- Verificar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em animais domésticos (cães e eqüinos).
- Comparar a técnica de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral em cães por meio de soro e sangue em papel filtro.
- Verificar que espécies de *Leishmania* estão ocorrendo em cães e eqüinos, por meio de técnicas parasitológicas e moleculares.
- Identificar o padrão de transmissão das leishmanioses no Assentamento Guaicurus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área de estudo

3.1.1 Aspectos gerais do Planalto da Bodoquena

A unidade geomorfológica denominada Planalto da Bodoquena encontra-se na parte centro-sul do Estado do Mato Grosso do Sul, como um extenso divisor de águas entre a Bacia do Rio Paraguai, a oeste e as sub-bacias do Apa, ao sul e do Miranda, a leste (Figura 1).

Figura 1 – Localização do Assentamento Guaicurus no Planalto da Bodoquena, Mato Grosso do Sul.

Compreende um conjunto de relevos serranos, dispostos na direção norte-sul, de caráter residual, por se encontrar circundado pela depressão do Rio Paraguai, onde o bloco mais representativo é formado pela Serra da Bodoquena (ALVARENGA *et al.* 1982).

A Serra da Bodoquena, considerada um planalto calcário, estende-se por, aproximadamente, 200km de comprimento e 65km de largura. Seu clima é basicamente tropical, a temperatura média anual é 22°C e a precipitação média é 1450 mm/ano. No inverno, por influência de massas polares, as chuvas não são intensas variando de 30 a 60 mm/mês, ficando o ambiente mais seco (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b).

A Serra da Bodoquena é um ecossistema único, onde há a confluência entre o Pantanal, os cerrados, o chaco e a Mata Atlântica, abrigando grande biodiversidade, com espécies exclusivas da região, muitas das quais ameaçadas de extinção (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003b).

A exploração de recursos naturais de acentuadas belezas cênicas e de inúmeros locais que permitem múltiplas atividades de lazer fizeram do sudoeste sul-mato-grossense um importante polo-turístico nacional e internacional. Assim, para tentar frear o processo de degradação que vem sofrendo, foi criado em 2000 o Parque Nacional da Serra da Bodoquena, com 76,4 mil hectares que tem auxiliado o desenvolvimento sustentado da região, dando suporte ao turismo (NUNES 2001).

3.1.2 Características locais do Assentamento Guaicurus

O Assentamento Guaicurus está situado na parte central da Serra da Bodoquena, a 20° 27' LS e 56° 52' LW, pertencente ao município de Bonito, MS, dista 68 km da sede do mesmo. Implantado pelo INCRA, na década de 80, em uma área de 2772 hectares compreende a sede e 131 lotes

dispostos em cinco linhas: Agrovila, Campina, Poção, Quatorze e da Sede que é um trecho de uma estrada estadual (Figura 2).

A estrada que liga a cidade de Bonito ao Assentamento Guaicurus, mesmo, sem pavimentação asfáltica e de conservação precária, permite o tráfego em todas estações do ano, o mesmo acontecendo com as vias que cortam o loteamento.

Da fauna de mamíferos silvestres no Assentamento relatada pelos moradores constam espécies como: lobinho, cutia, cateto, queixada, tatu, veado, macaco, quati, roedores, lebre e anta (NUNES 2001).

3.2 Inquérito de animais domésticos

3.2.1 População em estudo

O projeto, após submissão ao comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) (anexo 1), teve início com visitas domiciliares aos moradores do Assentamento Guaicurus, no final de fevereiro e primeira quinzena de março de 2003, com a finalidade de pesquisar cães (*Canis familiaris*) e cavalos (*Equus caballus*) existentes nas propriedades. Nas residências onde havia esses animais, esclareceu-se o objetivo do estudo e solicitou-se o consentimento dos proprietários para coleta de sangue dos mesmos.

Os animais foram examinados observando-se o seu estado geral e manifestações clínicas sugestivas de leishmaniose visceral ou tegumentar.

Dos 131 lotes existentes no Assentamento, estavam habitados 76 (58,0%) e foram colhidas amostras de sangue de cães e/ou cavalos em 58 deles (76,3%). Em relação aos 18 lotes restantes, em 9, não haviam esses

animais e nos demais, o proprietário não autorizou a coleta ou por outros motivos, não foi possível executá-la.

3.2.2 Colheita de sangue – primeira amostra

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia safena ou jugular com agulha 30x8 mm, nos cães e da jugular, com agulha 40x12 mm nos eqüinos. O sangue permaneceu em repouso para retração do coágulo, por tempo variável, sendo então centrifugado a 2500 r.p.m., por cinco minutos, para obtenção do soro.

Alíquotas do sangue colhido dos cães foram colocadas em papel filtro Whatman nº 1 que foi seco à temperatura ambiente.

As amostras de sangue em papel filtro e soro foram encaminhadas, devidamente identificadas e acondicionadas em caixas de isopor com gelo, para o Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores da Vigilância em Saúde da Prefeitura do Município de São Paulo (LabZoo-VIS), onde foram estocadas a -20°C , até o processamento.

As amostras de soro dos eqüinos foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

As amostras de sangue em papel filtro e soro dos cães foram processadas por meio da reação de imunofluorescência indireta e do ensaio imunoenzimático (EIE).

3.2.3 Colheita de aspirado medular e segunda amostra de sangue

Em junho de 2003, foram colhidos aspirados de medula óssea e novas amostras de sangue de animais que apresentaram resultados reagente ou inconclusivo, em pelo menos uma das técnicas sorológicas.

Aspirados de medula óssea foram colhidos da porção proximal da tíbia, com agulha 40x12 mm. A seguir, para a pesquisa do parasita pelos métodos convencionais, foram feitos esfregaços em lâminas, semeadura em meio de cultura acelular e inoculação em hamster *Mesocricetus auratus*. Os esfregaços e tubos de cultura foram encaminhados para o LabZoo-VIS e os hamsters para o Laboratório de Parasitologia da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP).

O sangue foi colocado em papel filtro, em tubo seco para obtenção do soro e em tubo com anticoagulante EDTA para obtenção do creme leucocitário.

As amostras de sangue em papel filtro e soro foram utilizadas para confirmação da reatividade.

O creme leucocitário foi separado do sangue por centrifugação a 3000 r.p.m. por dez minutos, em centrífuga Celm® – Combate. Aliquota do aspirado medular foi colocada em microtubo contendo tampão NET (150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,5), assim como o creme leucocitário. Ambos materiais foram mantidos em geladeira, transportados em isopor com gelo e armazenados no LabZoo-VIS em freezer -20°C, como descrito por REITHINGER *et al.* 2000.

Essas amostras foram obtidas para detecção de DNA do parasita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e identificação da espécie com o emprego da técnica de seqüenciamento, junto ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB /USP).

3.2.4 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

3.2.4.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As amostras foram testadas frente aos antígenos obtidos a partir de promastigotas das cepas de referência *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *L. (L.) chagasi* (MCER/BR/81/M6445), mantidas conforme descrito por SAN MARTIN-SAVANI (1998) e os antígenos preparados segundo GUIMARÃES *et al.* (1974).

Os soros dos equinos e dos cães, assim como os seus respectivos controles positivo e negativo, foram diluídos a 1:20 em solução salina tamponada pH 7,2 (SST) e depositados em áreas delimitadas nas lâminas previamente impregnadas com cada um dos antígenos, assim cada amostra foi colocada em 3 lâminas.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. A seguir, foram lavadas em dois banhos de SST de 10 minutos cada. Após a secagem, em temperatura ambiente, foi acrescentado anti-gamaglobulina total de cão ou anti-gamaglobulina total de equino (produzidos pelo LabZoo-VIS), marcados com isotiocianato de fluoresceína,

diluídos a 1:200 e 1:50, respectivamente, em azul de Evans 4 mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas como descrito acima.

As lâminas secas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,0 e lamínula, sendo a leitura efetuada em microscópio de imunofluorescência (Axioskop da Zeiss®) com aumento de 40X.

Foram consideradas reagentes, as amostras que apresentaram as promastigotas fluorescentes, inclusive no flagelo, e não reagentes, as amostras que apresentaram o parasita sem fluorescência com cor avermelhada.

Os soros reagentes foram novamente testados, para determinar o título de anticorpos presentes na amostra, em diluições seriadas na razão 2 a partir da diluição 1:20, ou seja, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320; 1:640 e assim por diante até a última diluição em que as formas promastigotas apresentaram fluorescência.

Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram título igual ou maior a 40. Nos soros em que existiram diferenças de título frente as três cepas de antígeno testadas, o título foi determinado pela reação frente ao antígeno de *L. (L.) chagasi*, visto este apresentar menos reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (BADARÓ *et al.* 1983).

As amostras de sangue dos cães em papel filtro Whatman nº1 foram eluídas, colocando-se dois círculos de 6mm de diâmetro em 160µl de solução salina tamponada, deixando na geladeira “overnight”. Posteriormente, foram testadas como descrito anteriormente. As amostras eluídas equivalem a uma diluição 1:40.

3.2.4.2 Ensaio imunoenzimático (EIE)

Os soros e os eluatos sanguíneos dos cães foram testados por meio do kit de EIE para leishmaniose canina produzido pelo Instituto Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz. Os ensaios foram realizados conforme protocolo que acompanha o kit.

As amostras de soros dos animais e os soros controles positivo e negativo do teste foram diluídos, em diluente de amostra acrescido de lectina de leite e adicionados na microplaca previamente adsorvida com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* (complexo *L. donovani*), obtidos a partir de meio de cultura.

A seguir, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e posteriormente lavada, em equipamento automático (Columbus Washer – TECAN®), por 6 vezes com tampão de lavagem (200µl/orifício) aguardando-se 30 a 60 segundos entre cada lavagem. Em seguida, foi colocada uma anti-gamaglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase e a microplaca foi novamente incubada e lavada.

Então, foi adicionado o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) acrescido do cromógeno tetra-metilbenzidine (TMB) e a microplaca foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos, em local abrigado da luz.

Posteriormente, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2M e a leitura efetuada em comprimento de onda de 450 nm (SPECTRA® III).

O valor de corte da reação, para determinar as amostras reagentes e não reagentes, foi calculado pela média das absorbâncias dos controles negativos multiplicada por 2.

As amostras de sangue dos cães colhidas em papel filtro Whatman nº 1 foram eluídas em tubos, colocando-se dois círculos de 6 mm e 400 µl do diluente de amostra, deixando-os sob leve agitação rotacional por uma hora e a seguir foram processadas, conforme descrito anteriormente.

O cálculo do valor de corte da reação, neste caso, foi a média das absorbâncias dos controles negativos multiplicada por 3.

A zona cinza da reação foi determinada entre o valor de corte e o valor obtido pela multiplicação deste por 1,2. As amostras de soro e sangue em papel filtro, que se apresentaram nesta faixa, foram retestadas. Aquelas que permaneceram na zona cinza foram consideradas inconclusivas.

As amostras de soro e de sangue em papel filtro dos cães, que não apresentaram resultados concordantes entre as duas técnicas sorológicas, foram testadas pelo menos mais uma vez por meio da RIFI e do EIE para confirmação dos resultados.

3.2.5 Pesquisa parasitológica de *Leishmania*

Os esfregaços de aspirado de medula óssea foram fixados com metanol por 2 minutos e corados pelo Giemsa por 1 hora. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico (Axiolab - Zeiss®), com aumento de 100X em imersão com óleo, para pesquisa de formas amastigotas.

As amostras de aspirado de medula semeadas em meio de cultura Blood Agar Base (WALTON *et al.* 1977) foram mantidas a 23°C em estufa incubadora B.O.D. modelo 347-CD (Fanem®). As culturas foram observadas, semanalmente, a partir do 5º até o 30º dia, para pesquisa de promastigotas.

Os hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com uma alíquota do aspirado medular foram examinados, semanalmente, a fim de observar sinais de leishmaniose. Esses animais foram necropsiados após 4 a 5 meses da inoculação e fragmentos de baço e fígado foram semeados em meio de cultura, como descrito anteriormente, para tentar isolar o parasita.

As promastigotas isoladas em culturas foram encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas em Belém, Pará, a fim de serem identificadas, conforme descrito por SHAW *et al.* (1989), por meio da reação de imunofluorescência frente a 23 anticorpos monoclonais.

3.2.6 Detecção molecular de *Leishmania*

3.2.6.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído segundo o protocolo descrito por ULIANA *et al.* (1991).

As amostras de aspirado de medula e creme leucocitário dos cães foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm (Centrífuga CR 3i – JOUAN®, rotor AC 2.14). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, acrescido de 500 µl de 1X solução salina tamponada (7 mM Na₂HPO₄, 26

mM NaH_2PO_4 , 130 mM NaCl), foi homogeneizado, novamente centrifugado e o sobrenadante retirado. Este procedimento de lavagem foi realizado por cinco vezes.

Finalmente, o sedimento foi ressuspensionado em 200 μl de TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0), homogeneizado e macerado. Foram adicionados 1% de Sódio-dodecil-sulfato (SDS) e 100 $\mu\text{g/ml}$ de pronase. A amostra foi levemente homogeneizada e incubada a 42°C por duas horas.

A seguir, foi acrescentado à amostra um volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a mistura foi homogeneizada cuidadosamente, e centrifugada a 13523 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada. A fase aquosa, retirada tendo-se o cuidado de não perturbar a interface, foi colocada em novo microtubo, ao qual foi adicionado, novamente, igual volume da solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguindo o mesmo procedimento por mais duas vezes.

Em seguida, foi acrescentado à amostra 1 volume de clorofórmio com álcool isoamílico (24:1), centrifugado e a fase aquosa retirada para novo microtubo. Este procedimento, também, foi realizado por três vezes.

À fase aquosa resultante foram adicionados acetato de sódio 0,3M e 2,5 volumes de álcool etílico absoluto gelado, levando-se ao freezer -20°C “overnight”.

A amostra foi centrifugada sob refrigeração por 10 minutos a 13523 g e o precipitado foi lavado com 500 μl de álcool etílico (70%) gelado.

O precipitado, depois de seco à temperatura ambiente foi ressuspensionado em 20 μl de TE e mantido em geladeira, até a realização da

PCR. As amostras de DNA foram testadas puras ou diluídas a 1:5 ou 1:10 em TE.

3.2.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizados os oligonucleotídeos S4 (5'- GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC -3') e S12 (5'- GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC -3') descritos em ULIANA *et al.* (1994), que são complementares a duas regiões do rDNA que codifica a subunidade 18S, idênticas em todas as espécies de *Leishmania*. Estes oligonucleotídeos permitiram a amplificação de um fragmento de 520 bp.

A PCR foi feita em um volume final de 50 µl, contendo tampão da enzima 1X, 2 mM cloreto de magnésio, 0,2 mM deoxinucleotídeos trifosfatos, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Recombinant Brazilian) e 2 µl de DNA da amostra (cerca de 20 ng de DNA).

Em cada teste foram incluídos como controle positivo, 40 ng de DNA extraído de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* ou *L. (V.) braziliensis*. O controle negativo foi feito com a adição de água bidestilada autoclavada ou TE, no lugar do DNA.

A reação era iniciada com um ciclo de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguindo-se 35 ciclos no termociclador Techgene (Uniscience®). Os ciclos foram de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1

minuto. Após o término da reação, era feita uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR eram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0) corado com brometo de etídeo 0,3 µg/ml, submetido a uma diferença de potencial de 3 a 5 V/cm até que o azul de bromofenol do tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 15% de ficoll tipo 400) percorresse mais de dois terços do gel. Utilizou-se DNA do fago Lambda clivado com a enzima de restrição *Hind* III ou 1Kb DNA ladder (Gibco-BRL), como padrão de tamanho molecular. As bandas foram observadas sob luz ultravioleta e registradas em câmara fotográfica Kodak ds ou Eagleeye II – Stratagene®.

3.2.6.3 “Nested” – PCR

Os oligonucleotídeos S4 e S12 são complementares a seqüências conservadas da subunidade 18S do DNA ribossômico, amplificando assim, seqüências que podem ser encontradas em outros tripanossomatídeos. Como nas amostras analisadas, havia a possibilidade de existirem outros tripanossomatídeos, tais como *Trypanosoma evansi*, foi feita uma segunda PCR, utilizando como molde o produto da primeira, com um par de oligonucleotídeos (S17 e S18) específicos para o gênero *Leishmania* (dados não publicados).

Essa segunda reação, executada num termociclador Genius (Uniscience®) com um ciclo de 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, seguiu as mesmas condições descritas anteriormente, utilizando como DNA alvo 1 µl da primeira reação com S4 e S12. O produto da PCR foi analisado, conforme descrito anteriormente. Nessa PCR o fragmento amplificado é de cerca de 490 bp.

3.2.6.4 Purificação de produto da PCR

Todo o produto da PCR com S17 e S18 foi purificado pelo método descrito por ZHEN e SWANK (1993), como resumido a seguir. Após a eletroforese em gel de agarose 2%, o gel foi recortado retirando-se um pequeno bloco da região abaixo da banda de DNA, acrescentando-se polietilenoglicol (PEG 6000) a 15%. Nessa canaleta, o DNA foi eletroeluído, aplicando-se uma corrente de 120 volts em cuba de eletroforese com tampão TAE 1X.

Após a saída do DNA do gel, monitorado por observação do gel em luz ultravioleta, a solução de PEG contendo o DNA foi retirada e colocada em microtubo tipo “eppendorf”. Eram feitos duas extrações de traços de agarose do DNA, com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA era precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 0,3M e 1 volume de isopropanol absoluto à temperatura ambiente. Após centrifugação, o

DNA precipitado foi lavado com 500 µl de álcool etílico (70%) gelado e depois de seco à temperatura ambiente foi ressuspendido em 10 µl de TE.

O fragmento de DNA purificado era quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose, comparando-se o tamanho da banda da amostra com a do padrão 1Kb DNA (Biolabs), e mantido em geladeira, até a realização da reação de seqüenciamento.

3.2.6.5 Seqüenciamento de DNA

A reação de seqüenciamento foi realizada empregando-se “DNA Sequencing Kit – Big Dye™ Terminator v 3.0 Cycle Sequencing – Applied Biosystems” (ABI Prism), onde se utilizou 0,16µM do oligonucleotídeo S18 e 10 a 20 ng do fragmento de interesse, como descrito por SANGER *et al.* (1977).

As seqüências de nucleotídeos foram determinadas automaticamente em aparelho 3700 DNA Analyzer (ABI Prism), analisadas e alinhadas por meio do programa de computador BioEdit (HALL 1999), e comparadas com as seqüências de nucleotídeos de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma evansi*, disponíveis no GeneBank.

3.3 Inquérito sobre flebotomíneos

3.3.1 Capturas com armadilhas luminosas, tipo CDC, com inseticida

- *Sítios de captura*

Os sítios de captura de flebotomíneos compreenderam diferentes ambientes de lotes, onde foram diagnosticados casos de LVA em cães, situados ao longo de todas as Linhas do Assentamento Guaicurus (NUNES *et al.* 2001).

Na Linha Campina abrangeu área de mata de encosta bastante alterada situada nas encostas de um morro, domicílio e peridomicílio (pocilga, galinheiro e abrigo de carneiros) do lote 124; área de mata de encosta relativamente preservada situada nas encostas de um morro, domicílio (figuras 3 e 4) e peridomicílio dos lotes n^{os} 19 e 20 (figura 5); área de cultivo de subsistência do lote 20.

Figura 3 – Vista frontal do domicílio do lote 20.

Figura 4 – Vista lateral de parte do domicílio e anexos do lote 20.

Figura 5 – Aspecto do galinheiro existente no peridomicílio do lote 20.

Na Linha da Sede incluiu área de mata de encosta bem preservada, domicílio e peridomicílio do lote nº 02.

Na Linha do Poção compreendeu o peridomicílio e domicílio do lote 35.

Na Linha Agrovila abrangeu área de cultivo de subsistência do lote 110, domicílio e peridomicílio dos lotes nºs 59, 102, 110 e uma gruta (figura 6), conhecida como Gruta do Olímpio, próxima ao lote 56, situada em uma encosta circundada por área de floresta submontana, relativamente bem preservada.

Figura 6 – Aspecto da gruta (Gruta do Olímpio) próxima ao lote 56.

Na Sede do Assentamento compreendeu o interior e o quintal de uma residência situada nas imediações da escola.

- *Técnicas de captura e procedimentos*

Os trabalhos iniciaram-se em novembro de 2002 e se estenderam até outubro de 2003.

Foram utilizadas armadilhas luminosas automáticas em miniatura – tipo CDC (NATAL *et al.* 1991) colocando-se no fundo um pedaço de papel filtro com inseticida, dispostas nos pontos de captura por moradores locais quinzenalmente, das 18h:00 às 6h:00, sem obedecer horários de verão (figura 7).

Figura 7 - CDC com inseticida colocada próxima ao galinheiro do lote 02.

Os insetos capturados foram acondicionados em placas de Petri, mantidos em refrigerador até serem enviados para o Laboratório de Phlebotominae do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) para identificação das espécies. As fêmeas ingurgitadas estão sendo conservadas em congelador para estudo do hábito alimentar.

3.3.2 Capturas com armadilhas tipo Shannon

- *Sítios de captura*

No peridomicílio e no domicílio do lote 20, peridomicílio dos lotes 02, 19, 40, 60, 115 e área de cultivo do lote 20.

- *Técnicas de captura e procedimentos*

Os trabalhos iniciaram-se em outubro de 2002 e se estenderam até outubro de 2003, sendo realizadas capturas mensais no intra e peridomicílio do lote 20 e esporádicas nos demais sítios de captura: peridomicílio dos lotes 02 (2 capturas), 19 (3), 40 (1), 60(1), 115 (1) e área de cultivo do lote 20 (1).

As capturas aconteceram das 18h:00 às 22h:00, com a utilização de armadilhas tipo Shannon, na cor preta (GALATI *et al.* 2001), iluminadas com luz fria, alimentadas por bateria de 12 volts (figura 8).

Figura 8 – Armadilha de Shannon colocada próximo ao galinheiro do lote 20.

Os flebotomíneos foram capturados em frascos individuais de polietileno. Os recipientes foram acondicionados em caixa de isopor,

revestidas internamente por gesso umedecido para garantia da temperatura e da umidade do micro-ambiente, até a chegada do material ao laboratório de campo.

As fêmeas foram dissecadas para verificação de infecção natural por flagelados. Aquelas que não apresentaram condições de dissecação e os machos foram enviados para o Laboratório de Phlebotominae do Departamento de Epidemiologia da FSP/USP para identificação da espécie, a fim de contribuir na investigação da fauna flebotomínea.

3.3.3 Capturas com armadilhas luminosas automáticas modificadas, tipo CDC, sem inseticida

Com intuito de capturar maior número de espécimes para investigação de infecção natural por *Leishmania* e melhor amostragem dos vários ambientes estudados, foram utilizadas, também, armadilhas luminosas modificadas (figura 9). Nesta a câmara coletora é disposta após a ventoinha, com um manguito fazendo sua junção ao corpo do aparelho (GALATI *et al.* 2003a).

Figura 9 – Armadilha automática luminosa com manguito colocada na mata.

- *Sítios de captura*

No peridomicílio dos lotes 02 (2 capturas), 19 (15), 20 (25), 40 (1), 59 (1), 60 (2), 110 (3), 115 (7), 121 (1), 124 (1); na área de mata dos lotes 02 (2), 19 (9), 20 (17); na gruta (11) existente na linha Agrovila, próxima ao lote 56 e gruta existente no lote 20 (7); no domicílio do lote 20 (7), 19 (12) e 124 (3); área de cultivo do lote 20(3) e do lote 110 (3).

- *Técnicas de captura e procedimentos*

As armadilhas foram ligadas por volta de 18h:00 e recolhidas às 6h:00. As capturas foram realizadas em outubro de 2002 e mensalmente de abril a outubro de 2003.

As câmaras coletoras foram vedadas e acondicionadas em caixa de isopor para transporte ao laboratório de campo. Neste, as mesmas foram

abertas em pequenas gaiolas e as fêmeas recapturadas em frascos individuais de polietileno.

As fêmeas foram dissecadas para observação de infecção natural. Os machos e as fêmeas que não apresentaram condições de dissecação foram enviados para identificação da espécie com o objetivo de auxiliar na pesquisa da fauna flebotomínea.

Os lotes do Assentamento Guaicurus, onde foram colocadas uma ou mais das armadilhas descritas anteriormente, encontram-se assinalados na figura 10.

Figura 10 – Mapa do Assentamento Guaicurus, Bonito - MS com a distribuição dos lotes, assinalados em amarelo, onde ocorreram capturas de flebotomíneos.

3.3.4 Investigação de infecção natural por *Leishmania*

Visando identificar e verificar a infecção natural, a fêmea foi imobilizada com éter etílico e colocada em lâmina seca e estéril para retirada das patas e asas. Então, foi transferida para uma gota de solução fisiológica estéril, onde se completou a dissecação, com exposição do tubo digestivo, para pesquisa de promastigotas e espermatecas, para identificação do flebotomíneo.

Alíquota da solução com a fêmea dissecada, que apresentou-se infectada por flagelados ao microscópio, foi semeada em meio de cultura BAB a fim de isolar formas promastigotas do parasita.

As fêmeas dissecadas pertencentes à mesma espécie, capturadas na mesma área e mesmo período foram colocadas no mesmo frasco contendo álcool etílico 70% (CABRERA *et al.* 2002) e submetidas à PCR.

O procedimento para extração de DNA do parasita no vetor foi estabelecido junto ao ICB/USP, utilizando-se fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas, experimentalmente, com *Leishmania (L.) amazonensis*. O protocolo empregado foi o mesmo utilizado para as amostras caninas (item 3.2.6.1), sendo que os lotes de flebotomíneos foram lavados somente duas vezes em 1X solução salina tamponada.

Além das PCR's efetuadas utilizando-se o gene SSU como alvo, conforme descrito anteriormente (itens 3.2.6.2 e 3.2.6.3), foi realizada outra reação empregando-se o gene G6PD como sequência alvo para detectar DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

Essa PCR foi executada, em equipamento Techgene (Uniscience®), segundo protocolo descrito por CASTILHO *et al.* (2003), com os oligonucleotídeos ISVA (5'- GTC GGT TAT CCT ATT CGG GTC -3') e ISVC (5'- ATC ACA ATG ATG GTC AAC GCA C -3').

3.3.5 Análise dos resultados entomológicos

A nomenclatura dos flebotomíneos seguiu a classificação proposta por GALATI (2003).

O Índice de Abundância de Espécies Padronizado (IAEP) foi calculado conforme ROBERTS e HSI (1979).

A abundância numérica e a distribuição espacial das espécies de flebotomíneos, encontradas nos vários tipos de ecótopos de um determinado ponto e período, foram estimadas por meio do Índice de Abundância das Espécies (IAE), conforme ROBERTS e HSI (1979), seguindo a fórmula:

$$IAE = \frac{a + Rj}{K}$$

Onde:

a = número de pontos de captura em que a espécie esteve ausente x *c*;

c = para cada sítio de captura, deve-se distribuir as espécies em postos, que variam de 1 a *n* (atribuindo-se o valor 1 para a espécie mais freqüente). O *c* compreenderá o maior valor de *n* obtido, considerando todos os sítios, acrescido de 1;

R_j = somatória das posições de cada espécie;

K = número de pontos de captura.

A conversão dos valores obtidos em uma escala entre zero e 1 foi obtida pela fórmula:

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

Neste índice, o valor 1 corresponde à espécie mais abundante e portanto, quanto mais o valor se aproximar de zero, menor a abundância da espécie.

A Média geométrica de Williams (X_w) (HADOW 1954, 1960), foi utilizada para avaliar as atividades das espécies de flebotomíneos mais abundantes, pois esta medida de tendência central reflete a frequência e a regularidade das espécies nas coletas.

A fórmula para cálculo foi:

$$\text{Média de Williams} = \log (X_w + 1) = \frac{\sum \log (n+1)}{N}$$

$$\text{Média de Williams} = X_w = \left[\text{antilog} \left(\frac{\sum \log (n+1)}{N} \right) \right] - 1$$

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

O Índice de Diversidade (D) foi calculado pela fórmula de MARGALEF (1949), conforme SERVICE (1993):

$$D = \frac{(s-1)}{\log_e N}$$

Onde:

s = número de espécies de flebotomíneos capturadas em um determinado período e ponto;

N = número de espécimes capturados neste mesmo período e tempo.

O cálculo dos índices de abundância e da diversidade das espécies, da média geométrica de Williams e análise da variação sazonal foram efetuados com os dados das capturas com armadilhas automáticas luminosas (CDC) com inseticida efetuadas, quinzenalmente, durante o período de novembro de 2002 a outubro de 2003.

4. RESULTADOS

4.1 Inquérito em animais domésticos

4.1.1 Inquérito de eqüinos

Foram processadas amostras de soro de 53 eqüinos de ambos os sexos, a maioria adultos, sendo que, em geral, apresentavam estado nutricional bom e aparência sadia. Todas as amostras testadas foram não reagentes e ao exame clínico os animais não apresentavam lesões sugestivas de LTA e nem sinais de LVA.

4.1.2 Inquérito canino

4.1.2.1 Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania*

Foram examinados 129 cães representando, praticamente, o universo da população canina do Assentamento Guaicurus.

Os animais eram de ambos os sexos, adultos e filhotes, sendo que, a maioria, apresentava estado nutricional bom e aparência sadia, exceto pela alta freqüência de infestação pela forma larvária de *Dermatobia hominis*. Em alguns cães foram observadas outras alterações no tegumento, tais como, dermatite semelhante à sarna e sinais de briga.

Os animais reagentes encontravam-se dispersos por todo o assentamento, como pode ser observado na figura 11.

Figura 11 - Distribuição dos lotes onde foi pesquisada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em cães, por meio da RIFI, no Assentamento Guaicurus, Bonito – MS. Naqueles assinalados em amarelo, os cães foram não reagentes e em rosa, reagentes.

Os resultados obtidos no inquérito canino empregando-se a RIFI e o EIE estão dispostos nas tabelas de 1 e 2.

Tabela 1 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (EIE) nas amostras de soro dos cães.

EIE _{SORO}	RIFI _{SORO}		Total
	Reagente	Não Reagente*	
Reagente	19	21	40
Não Reagente**	1	88	89
Total	20	109	129

* incluíram-se as com título 20.

** incluíram-se as inconclusivas.

Tabela 2 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático nas amostras de sangue em papel filtro (PF) dos cães.

EIE _{PF}	RIFI _{PF}		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	9	15	24
Não Reagente*	2	103	105
Total	11	118	129

* incluíram-se as inconclusivas.

A reatividade observada com o emprego da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no soro foi de 15,5% (20/129), com títulos variando de 40 a 640, e no sangue em papel filtro 8,5% (11/129).

A utilização do ensaio imunoenzimático (EIE) revelou para o soro 31,0% (40/129) e para o eluato sangüíneo 18,6% (24/129) de cães reagentes.

Entre os 129 cães pesquisados 9 (6,98%) foram reagentes, por meio das duas técnicas, tanto na amostra de soro como na amostra de eluato sanguíneo.

Os resultados da reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático das amostras de soro e sangue em papel filtro, de cada cão examinado no Assentamento Guaicurus, encontram-se no anexo 2.

4.1.2.2 Investigação dos cães reagentes e inconclusivos

Entre os 44 cães com resultados reagentes ou título 20 na RIFI ou EIE inconclusivo, no inquérito, foi possível examinar e colher novas amostras de sangue de 28 animais e destes, colher aspirado medular de 24 cães.

As manifestações clínicas observadas nesses 28 cães foram variáveis. Alguns animais mostraram emagrecimento acentuado, crescimento exagerado de unhas (figuras 12 e 13), ulcerações, queda de pêlo (figura 14), secreções oculares, enquanto que, outros se apresentaram assintomáticos (figura 15).

Figura 12 – Cão com emagrecimento e crescimento de unhas.

Figura 13 – Cão com emagrecimento acentuado e onicogrifose.

Figura 14 – Cão com alopecia e lesões no tegumento.

Figura 15 – Cão assintomático.

4.1.2.2.1 Segunda amostra de soro e eluato sanguíneo

As comparações entre os resultados obtidos na primeira e na segunda amostras de soro e sangue em papel filtro por meio de ambas as técnicas dos 28 cães analisados, podem ser observadas nas tabelas 3 a 6.

Tabela 3 – Resultados obtidos pela reação de imunofluorescência indireta entre a primeira e segunda amostras de soro dos 28 cães pesquisados.

RIFI ₂ SORO	RIFI ₁ SORO		Total
	Reagente	Não Reagente*	
Reagente	8	1	9
Não Reagente*	7	12	19
Total	15	13	28

* incluíram-se as com título 20.

Entre os resultados da primeira e segunda amostras de soro, testadas pela RIFI, houve 71,4% (8+ 12/28) de concordância.

Tabela 4 – Resultados obtidos entre a primeira e a segunda amostras de sangue em papel filtro por meio da reação de imunofluorescência indireta.

RIFI ₂ PF	RIFI ₁ PF		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	6	-	6
Não Reagente	1	21	22
Total	7	21	28

PF= papel filtro

Nas amostras de sangue em papel filtro, submetidas à RIFI, houve concordância de 96,4% (6+21/28) entre os resultados obtidos na primeira e segunda amostras.

Tabela 5 – Resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático entre a primeira e segunda amostras de soro dos 28 cães pesquisados.

EIE ₂ SORO	EIE ₁ SORO		Total
	Reagente	Não Reagente*	
Reagente	20	3	23
Não Reagente*	3	2	5
Total	23	5	28

* incluíram-se as inconclusivas.

Entre a primeira e segunda amostras de soro testadas pelo EIE, a concordância dos resultados foi de 78,6% (20+2/28).

Tabela 6 – Resultados obtidos entre a primeira e a segunda amostras de sangue em papel filtro por meio do ensaio imunoenzimático.

EIE ₂ PF	EIE ₁ PF		Total
	Reagente	Não Reagente*	
Reagente	14	8	22
Não Reagente*	-	6	6
Total	14	14	28

PF= papel filtro

* incluíram-se as inconclusivas.

A concordância entre os resultados da primeira e segunda amostras de sangue em papel filtro, testadas pelo EIE, foi de 71,4% (14+6/28).

Os resultados, de cada cão pesquisado, da segunda amostra de soro e eluato sanguíneo, a sintomatologia, e o motivo pelo qual não foram colhidas amostras dos demais cães reagentes ou inconclusivos, encontram-se no anexo 3.

4.1.2.2.2 Ocorrência de co-infecção

Nos esfregaços de aspirado de medula óssea corados pelo método de Giemsa, dos 24 cães foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* sp em somente um cão de nome Xebinha (nº 120), que também apresentava várias formas tripomastigotas, as quais, pela morfologia, foram identificadas como sendo de *Trypanosoma evansi* (figura 16).

Figura 16 – Várias amastigotas de *Leishmania* encontradas no esfregaço de aspirado de medula óssea do cão Xebinha (A). Uma forma amastigota e uma tripomastigota no esfregaço de medula óssea (B). Diversas formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* observadas em toda a extensão da lâmina desta amostra (C) (Fotos V. L. B. Nunes e I. M. N. Ilha).

A primeira e segunda amostras de soro deste animal foram também testadas por meio da reação de imunofluorescência indireta frente ao antígeno de *Trypanosoma cruzi* e apresentaram títulos, 20 e 160, respectivamente, enquanto que frente ao antígeno de *Leishmania (L.) chagasi*, mostraram-se não reagente e reagente com título 40, respectivamente.

O produto da PCR com os oligonucleotídeos S4 e S12, a partir de DNA extraído de aspirado de medula óssea e de creme leucocitário do cão Xebinha (nº 120) foi seqüenciado e identificado como *Trypanosoma evansi*. O produto da PCR com os oligonucleotídeos S17 e S18, empregando o amplificado obtido com S4 e S12, foi seqüenciado e identificado como *Leishmania (L.) chagasi* (figura 17).

Organismo	rDNA seqüência																					
	posição do nucleotídeo																					
	1708					1714					1721					1727						
<i>L. amazonensis</i>	G	A	A	T	T	G	C	C	C	A	T	~~	A	G	A	A	T	A	G	C	A	
<i>L. (Viannia)</i>	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	~~	.	.	G	.	.	.	.	.	.	
<i>L. chagasi</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	~~	.	.	G	.	.	.	.	.	.	
<i>T. cruzi</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	~~	.	.	G	.	.	.	.	.	.	
<i>T. evansi</i>	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	C	AC	.	.	G	.	C	.	.	.	.	
Cão Xebinha 1	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	C	AC	.	.	G	.	C	.	.	.	.	
Cão Xebinha 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	~~	.	.	G	.	.	.	.	.	.	

	1945					1954										1963						
<i>L. amazonensis</i>	C	A	C	A	T	A	G	A	C	C	C	A	C	T	T	G	G	G	A			
<i>L. (Viannia)</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>L. chagasi</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>T. cruzi</i>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>T. evansi</i>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cão Xebinha 1	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Cão Xebinha 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Figura 17 - Seqüências de nucleotídeos determinadas para o produto da PCR de DNA da amostra do **cão Xebinha**, alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, como descrito por ULIANA *et al.* (1994), permitindo a identificação dos parasitas deste animal. Produto da PCR com S4 e S12 (1) e “nested”-PCR com S17 e S18 (2) demonstrou infecção por *Trypanosoma evansi* e *Leishmania (L.) chagasi*, respectivamente. Os pontos representam bases idênticas a seqüência de *L. (L.) amazonensis* e o til representa a posição de inserções na seqüência de *T. evansi* para alinhar as seqüências das espécies de *Leishmania* com as do *Trypanosoma*.

4.1.2.2.3 Análise parasitológica

Entre os esfregaços de aspirado de medula óssea corados pelo Giemsa dos 24 cães pesquisados, somente foram encontradas formas amastigotas do parasita em um dos cães, como foi descrito no item anterior.

Em nenhuma das 24 amostras de aspirado de medula, semeadas em meio de cultura Blood Agar Base, foi possível demonstrar a presença de formas promastigotas do protozoário.

Das 24 amostras de aspirado de medula inoculadas, foi possível isolar promastigotas de *Leishmania* a partir de baço e fígado dos hamsters de dez cães, porém como os hamsters perderam a marcação, não foi possível saber quais eram. Essas culturas foram encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas, porém somente uma pôde ser identificada por imunofluorescência com anticorpos monoclonais (SHAW *et al.* 1989), sendo que a espécie encontrada foi *L. (L.) chagasi*.

4.1.2.2.4 Análise molecular

Os resultados obtidos na reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir das amostras de DNA extraídas de creme leucocitário e aspirado de medula óssea dos cães, encontram-se na tabela 7 e figuras 18 e 19.

Tabela 7: Resultados das PCR com os pares de oligonucleotídeos S4/S12 e S17/S18, utilizando amostras de DNA extraídas de creme leucocitário e aspirado de medula óssea de cães do Assentamento Guaicurus, município de Bonito, MS.

Resultados	Aspirado de medula óssea				Creme leucocitário			
	S4 e S12		S17 e S18*		S4 e S12		S17 e S18*	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Positivos	6	25,0	20	83,3	24	85,7	27	96,4
Negativos	18	75,0	4	16,7	4	14,3	1**	3,6
Total	24	100,0	24	100,0	28	100,0	28	100,0

*Essa reação foi executada empregando-se o produto da PCR com S4/S12, como descrito anteriormente.

** Deste animal não foi colhido aspirado de medula óssea (anexo 4).

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos **S4** e **S12**. M = marcador molecular *lambda/Hind* III; canaletas de 1 a 5 = DNA de amostras de creme leucocitário ou aspirado de medula óssea dos cães; 6 = DNA de promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (controle positivo); 7 = controle negativo sem DNA.

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR obtido com os oligonucleotídeos **S17** e **S18**. M = marcador molecular 1 kb DNA; canaletas de 1 a 22 = DNA de amostras de creme leucocitário ou aspirado de medula óssea dos cães; 23 = DNA de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (controle positivo); 24 = controle negativo sem DNA.

Na figura 18, ilustrativa dos resultados apresentados na tabela 7, percebe-se que as bandas de cerca de 520bp, resultantes da PCR com os oligonucleotídeos S4/S12, apresentaram-se ou muito fracas, por vezes, até de difícil visualização (canaleta 1); fracas (canaletas 2 e 3); ou fortes, porém com bandas inespecíficas (canaletas 4 e 5). O produto da PCR com os oligonucleotídeos S17/S18 (figura 19), mostraram bandas de cerca de 490bp fortes e sem a presença de bandas inespecíficas (canaletas 2; 3; 7; 8; 13; 14; 16 a 22).

A positividade para DNA de *Leishmania* nas amostras caninas de creme leucocitário foi de 96,4%, enquanto que nas de aspirado de medula óssea foi de 83,3%. Os quatro cães que se apresentaram negativos na PCR com DNA extraído de aspirado de medula óssea, foram positivos com o creme leucocitário.

Entre os 28 cães pesquisados, foram detectados por meio da PCR com S17/S18, 27 animais infectados por *Leishmania*. O seqüenciamento com S18 do produto dessa PCR, demonstrou 19 cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, 6 por *Leishmania (Viannia) sp* e 2 cães por *Leishmania (L.) amazonensis* (figura 20).

Organismo	rDNA seqüência															
	posição do nucleotídeo															
	1708					1714						1721				1727
<i>L. amazonensis</i>	G	A	A	T	T	G	C	C	C	A	T	A	G	A	A	T
<i>L. (Viannia)</i>	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
<i>L. chagasi</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
Cão Camoio	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
Cão Trovão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cão Pitoco	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.

	1945						1954								1963
<i>L. amazonensis</i>	C	A	C	A	T	A	G	A	C	C	C	A	C	T	T
<i>L. (Viannia)</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. chagasi</i>	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
Cão Camoio	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cão Trovão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Cão Pitoco	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.

Figura 20 - Seqüências de nucleotídeos determinadas para o produto da “nested”-PCR de DNA das amostras alinhadas com as seqüências de cepas de referência do SSU rDNA, conforme descrito por ULIANA *et al.* (1994), permitindo a identificação da espécie de *Leishmania*. Cão Pitoco está infectado por *L. (L.) chagasi*, cão Trovão por *L. (L.) amazonensis* e cão Camoio por *L. (Viannia) sp*. Os pontos representam bases idênticas a seqüência de *L. (L.) amazonensis*.

Os resultados das reações em cadeia da polimerase para cada animal, encontram-se no anexo 4.

4.1.2.2.5 Sintomatologia e reatividade dos cães infectados

A análise do quadro clínico, ou seja, a presença ou ausência de sintomas característicos de leishmaniose, e da reatividade sorológica dos 27 cães infectados por *Leishmania*, detectados pela PCR, pode ser observada nas tabelas 8 a 10.

Tabela 8 – Distribuição dos 27 cães com PCR (S17/S18) positiva para *Leishmania* e destes, os reagentes pela RIFI ou EIE na segunda amostra de soro, segundo os sinais clínicos.

Sintomas	PCR		EIE		RIFI	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sintomático	17	63,0	15	68,2	8	88,9
Assintomático	10	37,0	7	31,8	1	11,1
Total	27	100,0	22	100,0	9	100,0

Entre os 27 cães infectados por *Leishmania*, detectados pela PCR com os oligonucleotídeos S17 e S18, observou-se que 37% (10) eram assintomáticos e 63% sintomáticos (tabela 8), destes, 41% eram oligossintomáticos (11 animais com um ou dois sintomas) e 22% polissintomáticos (6 cães com três ou mais sintomas). Os sintomas observados foram perda de peso, onicogrifose, conjuntivite, alopecia, dermatites e úlceras de pele.

Entre os cães infectados que foram reagentes pela RIFI, 88,9% apresentavam sintomas e 11,1% eram assintomáticos, enquanto que

daqueles que foram reagentes pelo EIE, 68,2% eram sintomáticos e 31,8% não apresentavam sintomas (tabela 8).

Tabela 9 – Distribuição dos cães reagentes na segunda amostra de soro pela RIFI ou EIE, segundo os sinais clínicos sugestivos de leishmanioses, dentre os 27 cães infectados por *Leishmania* detectados pela PCR (S17/S18).

Sintomas	PCR		EIE		RIFI	
	Nº	Nº	%	Nº	%	
Sintomático	17	15	88,2 (15/17)	8	47,1 (8/17)	
Assintomático	10	7	70,0 (7/10)	1	10,0 (1/10)	
Total	27	22	81,5 (22/27)	9	33,3 (9/27)	

Entre os cães infectados por protozoários do gênero *Leishmania* (27 animais) foi possível detectar anticorpos na segunda amostra de soro de 81,5% destes animais pelo EIE e de 33,3% pela RIFI. O EIE detectou 88,2% dos animais sintomáticos e 70,0% dos assintomáticos, enquanto a RIFI detectou 47,1% e 10,0%, respectivamente (tabela 9).

Tabela 10 – Distribuição dos cães reagentes na primeira amostra de soro pela RIFI ou EIE, segundo os sinais clínicos sugestivos de leishmanioses, dentre os 27 cães infectados por *Leishmania* detectados pela PCR (S17/S18).

	PCR		EIE		RIFI	
Sintomas	Nº	Nº	%	Nº	%	
Sintomático	17	17	100,0 (17/17)	10	58,8 (10/17)	
Assintomático	10	7	70,0 (7/10)	5	50,0 (5/10)	
Total	27	24	88,9 (24/27)	15	55,6 (15/27)	

Na primeira amostra de soro desses animais infectados, o EIE detectou 88,9% enquanto a RIFI 55,6%. O EIE detectou todos os animais sintomáticos e 70,0% dos assintomáticos, a RIFI demonstrou presença de anticorpos em 58,8% dos sintomáticos e em 50,0% dos cães sem sintomas da doença (tabela 10).

O único cão que foi negativo nas PCR's, com DNA extraído a partir de creme leucocitário, não apresentava sintomas da doença. A segunda amostra de soro e de eluato sanguíneo desse animal foram não reagentes pela RIFI e pelo EIE, somente a primeira amostra de soro pelo EIE foi inconclusiva.

4.2 Inquérito sobre a fauna flebotomínea

4.2.1 Fauna encontrada

A fauna flebotomínea capturada no Assentamento Guaicurus compreendeu 4 subtribos, 9 gêneros e 15 espécies:

BRUMPTOMYIINA: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942).

LUTZOMYIINA: *Evandromyia* (*Barrettomyia*) *corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989), *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* Galati & Nunes, 1999, *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia dispar* Martins & Silva, 1963, *Pintomyia* (*Pintomyia*) *kuscheli* (Le

Pont, Martinez, Torrez-Espejo & Dujardin, 1998), *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927);

PSYCHODOPYGINA: *Martinsmyia oliveirai* (Martins, Silva & Falcão, 1970), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *punctigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1944), *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Dyar, 1929) e

SERGENTOMYIINA: *Micropygomyia* (*Sauromyia*) *peresi* (Mangabeira, 1942), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929).

4.2.2 Comportamento da fauna

4.2.2.1 Densidade

O total de flebotomíneos capturados em armadilhas automáticas luminosas com e sem inseticida e de Shannon no Assentamento Guaicurus, no período de outubro de 2002 a outubro de 2003, segundo sexo, espécie e lote de captura e por ambiente, pode ser visto nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Flebotomíneos capturados em armadilhas de Shannon e CDC com e sem inseticida no Assentamento Guaicurus, outubro de 2002 a outubro de 2003, segundo sexo, espécie e lote de captura.

Espécie	LOTE																											
	2				19				20				35				59				102				110			
	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%
<i>Brumptomyia avellari</i>	2	3	5	0,03	2	3	5	0,03	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Brumptomyia brumpti</i>	3	4	7	0,04	1	3	4	0,02	3	2	5	0,03	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Brumptomyia cunhai</i>	29	46	75	0,38	20	9	29	0,15	14	24	38	0,19	3	3	6	0,03	0	0	0	0,00	0	4	4	0,02	13	8	21	0,11
<i>Brumptomyia</i> sp *	1	0	1	0,01	4	0	4	0,02	4	0	4	0,02	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Evandromyia corumbaensis</i>	20	0	20	0,10	19	0	19	0,10	36	3	39	0,20	0	0	0	0,00	7	1	8	0,04	5	1	6	0,03	0	0	0	0,00
<i>Lutzomyia almerioi</i>	5	4	9	0,05	700	181	881	4,51	919	834	1753	8,97	0	1	1	0,01	6	6	12	0,06	0	2	2	0,01	4	4	8	0,04
<i>Lutzomyia dispar</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	47	106	153	0,78	3691	6118	9809	50,20	711	2592	3303	16,91	1	8	9	0,05	8	23	31	0,16	5	8	13	0,07	30	80	110	0,56
<i>Martinsmyia oliveirai</i>	0	0	0	0,00	5	0	5	0,03	13	2	15	0,08	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Micropygomyia peresi</i>	0	0	0	0,00	2	0	2	0,01	19	6	25	0,13	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	0	0,00	3	1	4	0,02	18	8	26	0,13	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	2	2	0,01	0	0	0	0,00
<i>Nyssomyia whitmani</i>	6	4	10	0,05	104	282	386	1,98	41	87	128	0,66	0	0	0	0,00	1	1	2	0,01	1	1	2	0,01	1	0	1	0,01
<i>Pintomyia (P.) kuscheli</i>	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	13	0	13	0,07	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	2	0	2	0,01
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	8	4	12	0,06	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	0	1	1	0,01
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0	6	6	0,03	16	228	244	1,25	1	81	82	0,42	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	1	3	0,02	8	8	16	0,08	13	7	20	0,10	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	2	2	0,01
TOTAL	115	174	289	1,48	4577	6833	11410	58,40	1814	3650	5464	27,97	4	12	16	0,08	24	31	55	0,28	12	18	30	0,15	50	95	145	0,74

F = fêmea

M = macho

* provavelmente represente fêmea de uma das espécies de *Brumptomyia* encontradas no Assentamento Guaicurus

continua

continuação

Espécie	LOTE																								TOTAL							
	115				121				124				56				40				Sede				60							
	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%
<i>B. avellari</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	4	6	10	0,05
<i>B. brumpti</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	8	9	17	0,09
<i>B.cunhai</i>	2	2	4	0,02	0	1	1	0,01	4	1	5	0,03	7	16	23	0,12	0	0	0	0,00	0	1	1	0,01	0	0	0	0,00	92	115	207	1,06
<i>Brumptomyia</i> sp *	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	9	0	9	0,05
<i>E. corumbaensis</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	10	1	11	0,06	5	3	8	0,04	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	103	9	112	0,57
<i>L. almerioi</i>	25	3	28	0,14	9	10	19	0,10	10	13	23	0,12	889	303	1192	6,10	12	0	12	0,06	0	0	0	0,00	2	0	2	0,01	2581	1361	3942	20,18
<i>L. dispar</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01
<i>L. longipalpis</i>	32	25	57	0,29	38	40	78	0,40	168	373	541	2,77	5	20	25	0,13	2	4	6	0,03	0	0	0	0,00	1	4	5	0,03	4739	9401	14140	72,37
<i>M. oliveirai</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	26	19	45	0,23	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	44	21	65	0,33
<i>M. peresi</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	22	6	28	0,14
<i>M. quinquefer</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	1	1	0,01	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	21	12	33	0,17
<i>N. whitmani</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	4	17	21	0,11	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	2	0	2	0,01	0	0	0	0,00	160	392	552	2,83
<i>P.(P.) kuscheli</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	18	0	18	0,09
<i>P. punctigeniculata</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	2	0	2	0,01	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	13	5	18	0,09
<i>P. shannoni</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	4	4	0,02	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	17	319	336	1,72
<i>S. sordellii</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	4	2	6	0,03	1	1	2	0,01	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	0	0	0	0,00	29	21	50	0,26
TOTAL	59	30	89	0,46	47	51	98	0,50	202	411	613	3,14	935	363	1298	6,64	14	4	18	0,09	3	1	4	0,02	5	4	9	0,05	7861	11677	19538	100,00

Tabela 12 - Flebotomíneos capturados em armadilhas de Shannon e CDC com e sem inseticida, segundo sexo, espécie e ambiente de captura, Assentamento Guaicurus, outubro/2002 a outubro/2003.

ESPÉCIE	AMBIENTE												TOTAL			
	Domicílio				Peridomicílio				Mata							
	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%	F	M	T	%
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	0	0	0,00	1	3	4	0,02	3	3	6	0,03	4	6	10	0,05
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	1	1	0,01	2	6	8	0,04	6	2	8	0,04	8	9	17	0,09
<i>Brumptomyia cunhai</i>	1	3	4	0,02	43	49	92	0,47	48	63	111	0,57	92	115	207	1,06
<i>Brumptomyia</i> sp	0	0	0	0,00	5	0	5	0,03	4	0	4	0,02	9	0	9	0,05
<i>Evandromyia corumbaensis</i>	10	4	14	0,07	34	0	34	0,17	59	5	64	0,33	103	9	112	0,57
<i>Lutzomyia almerioi</i>	117	95	212	1,09	1304	831	2135	10,93	1160	435	1595	8,16	2581	1361	3942	20,18
<i>Lutzomyia dispar</i>	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	1	0	1	0,01	1	0	1	0,01
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	107	232	339	1,74	4113	7849	11962	61,22	519	1320	1839	9,41	4739	9401	14140	72,37
<i>Martinsmyia oliveirai</i>	0	0	0	0,00	5	2	7	0,04	39	19	58	0,30	44	21	65	0,33
<i>Micropygomyia peresi</i>	1	0	1	0,01	1	0	1	0,01	20	6	26	0,13	22	6	28	0,14
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	1	1	0,01	5	2	7	0,04	16	9	25	0,13	21	12	33	0,17
<i>Nyssomyia whitmani</i>	6	4	10	0,05	130	325	455	2,33	24	63	87	0,45	160	392	552	2,83
<i>Pintomyia (P.) kuscheli</i>	2	0	2	0,01	6	0	6	0,03	10	0	10	0,05	18	0	18	0,09
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	0	1	1	0,01	9	4	13	0,07	4	0	4	0,02	13	5	18	0,09
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0	1	1	0,01	13	259	272	1,39	4	59	63	0,32	17	319	336	1,72
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	2	3	0,02	18	6	24	0,12	10	13	23	0,12	29	21	50	0,26
TOTAL	245	344	589	3,01	5689	9336	15025	76,90	1927	1997	3924	20,08	7861	11677	19538	100,00

F = fêmea

M = macho

* provavelmente representante fêmea de uma das espécies de *Brumptomyia* encontradas no Assentamento Guaicurus

Em relação ao número total de flebotomíneos capturados, a espécie predominante foi *Lutzomyia longipalpis* (72,4%), seguida por *Lutzomyia almerioi* (20,2%), *Nyssomia whitmani* (2,8%), *Psathyromyia shannoni* (1,7%), *Brumptomyia cunhai* (1,1%), *Evandromyia corumbaensis* (0,6%).

Lutzomyia longipalpis foi a espécie que predominou em 11 dos 14 lotes de captura, *Lutzomyia almerioi* predominou em 2 lotes e somente em um dos lotes, onde o número de flebotomíneos capturados foi muito pequeno (4 exemplares), *Nyssomia whitmani* predominou.

Em relação ao ambiente, considerando-se o total de flebotomíneos capturados, o maior número de flebotomíneos foi encontrado no peridomicílio (76,9%) e *Lutzomyia longipalpis* foi a espécie que predominou em todos os ambientes estudados.

De todos os pontos onde foram realizadas as coletas, no lote 19 capturou-se 58,4% e no lote 20, 28,0% do total de espécimes. Portanto, esses dois lotes responderam por cerca de 86% do total capturado e localizam-se em uma mesma linha.

Os outros três locais que se destacaram pelo número de flebotomíneos capturados foram a gruta próxima ao lote 56, o lote 124 e o lote 2, representando, 6,64 %, 3,14 % e 1,48 %, respectivamente. As demais localidades contribuíram com apenas 2,4 % do total de espécimes capturados.

4.2.2.2 Diversidade

O total de flebotomíneos capturados, quinzenalmente, em armadilha CDC com inseticida, no período de novembro de 2002 a outubro de 2003, os índices de diversidade e a média de flebotomíneos por captura encontram-se na tabela 13.

Tabela 13 - Flebotomíneos capturados em armadilha automática luminosa com inseticida, segundo os sítios de captura e as espécies, Índice de Diversidade e Média de captura, novembro/02 a outubro/03.

Local de captura	L. 35	L. 35	L. 02	L. 02	L. 02	L. 20	L. 20	L. 20	L. 20	L. 59	L. 59	L. 102	L. 102	L. 56	L. 19	L. 19	L. 19
Espécies	Casa	Peri	Peri	Casa	Mata	Peri	Casa	Cultivo	Mata	Casa	Peri	Casa	Peri	Gruta	Peri	Mata	Casa
<i>L. longipalpis</i>	5	4	54	4	47	141	132	156	1109	22	2	10	2	0	7836	174	40
<i>L. almerioi</i>	0	1	2	0	3	32	10	3	286	7	3	0	0	322	658	22	2
<i>N. whitmani</i>	0	0	3	0	4	17	0	7	56	0	2	2	0	0	346	10	3
<i>P. shannoni</i>	0	0	2	0	1	5	1	0	39	0	0	0	0	0	189	19	0
<i>P. punctigeniculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>E. corumbaensis</i>	0	0	2	0	6	2	1	1	12	3	4	5	1	6	2	9	1
<i>S. sordellii</i>	0	0	1	0	1	3	0	1	5	0	1	0	0	1	7	7	1
<i>M. oliveirai</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	7	0	0	0	0	20	0	3	0
<i>P. kuscheli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>M. peresi</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>M. quinquefer</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>B. cunhai</i>	1	5	0	1	3	5	0	1	25	0	0	0	4	5	0	10	0
<i>B. brumpti</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>B. avellari</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
<i>Brumptomyia</i> sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. dispar</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	6	10	65	5	66	207	145	171	1572	33	13	17	7	354	9042	260	48
Média de captura**	0,27	0,45	2,95	0,23	3,00	9,41	6,59	7,77	71,45	1,50	0,59	0,77	0,32	16,09	411,00	11,82	2,18
I. Diversidade (D)	0,56	0,87	1,44	0,62	1,67	1,31	0,80	1,17	1,77	0,86	1,95	0,71	1,03	0,68	0,99	2,16	1,29

L = Lote

* provavelmente represente fêmea de uma das espécies de *Brumptomyia* encontradas no Assentamento Guaicurus

** a média de captura foi feita considerando-se ter ocorrido duas capturas mensais em cada ponto no período de estudo, com exceção de novembro e dezembro de 2002, quando ocorreu apenas uma captura no mês (foram 22 capturas no total do período).

Continua

continuação

Local de captura	Sede	Sede L. 110	L. 110 L. 110	L. 110 L. 124	L. 124 L. 124	L. 124 L. 124	Total
Espécies	Casa	Peri	Peri Cultivo	Casa	Casa Mata	Peri	
<i>L. longipalpis</i>	0	0	41	6	58	9	10380
<i>L. almerioi</i>	0	0	1	1	0	0	1376
<i>N. whitmani</i>	1	0	0	0	1	0	473
<i>P. shannoni</i>	0	0	0	0	0	3	260
<i>P. punctigeniculata</i>	0	0	0	0	1	0	3
<i>E. corumbaensis</i>	0	0	0	0	0	10	66
<i>S. sordellii</i>	0	1	0	0	3	4	38
<i>M. oliveirai</i>	0	0	0	0	0	0	32
<i>P. kuscheli</i>	0	0	1	0	1	0	14
<i>M. peresi</i>	0	0	0	0	0	0	12
<i>M. quinquefer</i>	0	0	0	0	0	0	11
<i>B. cunhai</i>	0	0	8	6	1	5	80
<i>B. brumpti</i>	0	0	0	0	0	1	9
<i>B. avellari</i>	0	0	0	0	0	0	4
<i>Brumptomyia</i> sp*	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. dispar</i>	0	0	0	0	0	0	1
Total	1	1	51	13	65	10	12761
Média de captura**	0,05	0,05	2,32	0,59	2,95	0,45	580,05
I. Diversidade (D)	0,00	0,00	0,76	0,78	1,20	0,43	1,59

Os índices de diversidade das espécies de flebotomíneos variou de 1,12 a 2,16 nas matas, de 0,76 a 1,95 nos peridomicílios e de 0,43 a 1,29 nos domicílios, sendo que nestes, em sua maioria, foi menor que 1,00.

Cabe ressaltar que o índice de diversidade sofre influência não só do número de espécies encontradas em determinado local, mas também do número de espécimes. Assim, pôde-se observar índices mais elevados, como no peridomicílio do lote 59 (1,95), onde foram observadas 6 espécies entre os 13 espécimes capturados, do que os encontrados em alguns locais, como na mata do lote 20 (1,77), onde foram encontradas 14 espécies entre os 1572 flebotomíneos capturados.

O índice de diversidade das espécies nas matas, em geral, foi mais alto, em virtude do número mais elevado de espécies e as frequências não serem tão elevadas, enquanto que, nos domicílios foi baixo. No peri e intradomicílio da sede do Assentamento o índice foi zero.

4.2.2.3 Sazonalidade

A distribuição mensal dos 12761 espécimes de flebotomíneos capturados em armadilha automática luminosa com inseticida no Assentamento Guaicurus e das chuvas registradas no mesmo período, novembro de 2002 a outubro de 2003, no Município de Bonito está demonstrada na figura 21.

Figura 21 - Total de flebotomíneos capturados, mensalmente, em armadilha CDC com veneno e precipitação mensal no Município de Bonito - MS, novembro/02 a outubro/03.

A distribuição mensal das chuvas ocorridas no período de abril de 2002 a outubro de 2003 e da média mensal do período de 1981 a 2003, encontram-se no anexo 5.

As médias geométricas de Williams obtidas para *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia almerioi* e *Nyssomia whitmani*, espécies mais frequentes no Assentamento, segundo os ambientes de captura com armadilhas automáticas luminosas com inseticida, encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 - Média de Williams para as três espécies de flebotomíneos mais freqüentes do Assentamento Guaicurus, segundo os ambientes de captura com CDC com inseticida, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Ambiente					
Espécie	Mata	Cultivo	Peridomicílio	Intradomicílio	Total
Nº de pontos	4	2	9	9	24
<i>Lu. longipalpis</i>	253,23	32,15	26,66	13,26	30,70
<i>Lu. almerioi</i>	26,29	1,83	4,44	0,86	3,51
<i>Ny. whitmani</i>	13,97	1,83	3,32	0,54	2,48

As médias geométricas de Williams encontradas, mensalmente, para machos e fêmeas dessas espécies no total dos sítios de captura com armadilhas automáticas luminosas com inseticida, estão apresentadas na tabela 15.

Essas médias de Williams e a distribuição mensal das chuvas no Município de Bonito, de novembro de 2002 a outubro de 2003, encontram-se na figura 22.

Tabela 15 - Média de Williams mensal de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Lu. almerioi*, capturadas com CDC com inseticida, Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Espécie	<i>Lu. longipalpis</i>		<i>Ny. whitmani</i>		<i>Lu. almerioi</i>	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Novembro	0,78	0,53	0,03	0,00	0,11	0,25
Dezembro	1,76	1,07	0,00	0,03	0,60	0,87
Janeiro	0,54	0,44	0,04	0,00	0,15	0,20
Fevereiro	1,08	1,22	0,21	0,12	0,43	0,95
Março	0,73	0,50	0,13	0,14	0,14	0,17
Abril	0,71	0,59	0,13	0,15	0,10	0,21
Maio	0,15	0,08	0,00	0,00	0,04	0,01
Junho	0,61	0,47	0,23	0,12	0,16	0,27
Julho	1,29	0,78	0,38	0,14	0,16	0,31
Agosto	0,49	0,20	0,07	0,08	0,17	0,19
Setembro	0,29	0,18	0,00	0,01	0,07	0,14
Outubro	0,17	0,12	0,00	0,00	0,12	0,22

Figura 22 – Média de Williams mensal de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Lu. almerioi*, Assentamento Guaicurus e precipitação mensal no Município de Bonito, novembro/2002 a outubro/2003.

As médias geométricas de Williams mensais observadas para machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia almerioi* e *Nyssomia whitmani* em alguns ecótopos do Assentamento encontram-se nas tabelas 16 a 18 e figuras 23 a 25.

As médias de Williams obtidas, mensalmente, por sexo para cada local de captura estão dispostas nos anexos 6 ao 11.

Tabela 16 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 19 - peri												
Machos	0,0	286,7	15,9	566,5	297,5	228,1	1,2	571,8	16,5	27,1	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	171,2	4,8	807,2	69,2	99,2	2,5	223,9	10,2	6,8	0,0	3,6
L 56 - gruta												
Machos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 20 - casa												
Machos	0,0	1,0	0,0	0,0	0,7	0,4	0,0	1,7	7,6	2,5	0,4	0,7
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	1,0	0,0	2,5	4,2	0,4	0,0	0,0
L 20 - mata												
Machos	4,0	4,0	0,4	23,5	2,3	11,3	0,4	6,3	20,8	1,2	0,0	1,0
Fêmeas	1,0	1,0	0,4	20,2	1,0	0,0	0,4	5,0	10,8	0,7	1,0	0,4

L = Lote

—◆— Machos —□— Fêmeas

Figura 23 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* para alguns ecótopos, novembro/02 a outubro/03.

Tabela 17 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. almerioi* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 19 - peri												
Machos	0,0	3,0	0,0	2,2	0,4	0,4	0,0	5,3	1,0	2,9	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	63,0	0,0	63,4	3,9	5,3	0,4	20,0	4,9	6,3	0,0	14,5
L 56 - gruta												
Machos	1,0	8,0	4,1	13,5	4,1	1,5	1,7	1,8	0,4	1,8	0,7	1,8
Fêmeas	5,0	14,0	6,5	41,2	4,7	2,3	0,0	2,3	1,5	0,0	0,4	8,2
L 20 - casa												
Machos	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	1,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
L 20 - mata												
Machos	6,0	12,0	1,5	11,0	0,7	0,4	0,0	0,7	2,7	4,0	0,0	0,4
Fêmeas	2,0	23,0	8,0	49,5	0,4	0,7	0,0	1,8	4,8	3,1	1,5	0,0

L = Lote

Figura 24 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Lu. almerioi* para alguns ecótopos, novembro/02 a outubro/03.

Tabela 18 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Ny. whitmani* para alguns ecótopos, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 19 - peri												
Machos	0,0	0,0	0,7	17,3	6,1	14,5	0,0	55,5	5,2	0,7	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	7,4	6,4	6,4	0,0	14,2	0,0	1,0	0,0	0,0
L 56 - gruta												
Machos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 20 - casa												
Machos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 20 - mata												
Machos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,4	0,4	0,0	0,0
Fêmeas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Figura 25 - Média de Williams para machos e fêmeas de *Ny. whitmani* para alguns ecótopos, novembro/02 a outubro/03.

4.2.2.4 Abundância

O índice de abundância padronizado está disposto na tabela 19.

Tabela 19 - Índice de Abundância da Espécie Padronizado (IAEP) dos flebotomíneos capturados em CDC com veneno, Assentamento Guaicurus, novembro/2002 a outubro/2003.

Espécies	IAEP	Posição
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0,866	1 ^a
<i>Lutzomyia almerioi</i>	0,606	2 ^a
<i>Evandromyia corumbaensis</i>	0,506	3 ^a
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0,490	4 ^a
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0,468	5 ^a
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0,386	6 ^a
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0,266	7 ^a
<i>Pintomyia (P.) kuscheli</i>	0,156	8 ^a
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0,114	9 ^a
<i>Martinsomyia oliveirai</i>	0,097	10 ^a
<i>Micropygomyia peresi</i>	0,084	11 ^a
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0,079	12 ^a
<i>Brumptomyia avellari</i>	0,061	13 ^a
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	0,061	13 ^a
<i>Brumptomyia sp</i>	0,007	14 ^a
<i>Lutzomyia dispar</i>	0,003	15 ^a

A espécie de flebotomíneo mais abundante no Assentamento Guaicurus foi *Lutzomyia longipalpis*, seguida por *Lutzomyia almerioi*, *Evandromyia corumbaensis* e *Nyssomyia whitmani*.

4.2.3 Infecção natural por *Leishmania*

4.2.3.1 Métodos convencionais

Os números de fêmeas dissecadas e encontradas infectadas, ao microscópio ótico, conforme as espécies e os lotes de captura, podem ser vistos na tabela 20.

Tabela 20 - Número de fêmeas de flebotomíneos dissecadas e infectadas por flagelados, conforme observação microscópica, segundo espécie e o lote de captura, Assentamento Guaicurus, outubro/02 a outubro/03.

Espécie	Lote																		Total		
	2		19		20		40		56		60		110		115		124				
	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	%
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Brumptomyia cunhai</i>	3	0	12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	19	0	0
<i>Brumptomyia</i> sp*	1	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>Evandromyia corumbaensis</i>	2	0	5	0	18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0
<i>Lutzomyia almerioi</i>	2	0	50	0	590	3	2	0	183	0	2	0	0	0	7	0	0	0	836	3	0,36
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	0	281	0	145	0	2	0	3	0	1	0	0	0	2	0	2	0	438	0	0
<i>Martinsmyia oliveirai</i>	0	0	2	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
<i>Micropygomyia peresi</i>	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	2	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	6	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0
<i>Pintomyia (P.) kuscheli</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	0	0	1	0	5	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
<i>Sciopemyia</i> sp	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Total	10	0	365	0	808	3	4	0	189	0	5	0	3	0	9	0	2	0	1395	3	0,22

Dis = Dissecada

Inf = Infectada

* provavelmente represente fêmea de uma das espécies de *Brumptomyia* encontradas no Assentamento Guaicurus

Entre as fêmeas dissecadas, foram observadas ao microscópio 3 fêmeas de *Lutzomyia almerioi* infectadas por flagelados, capturadas no lote 20. A taxa de infecção encontrada em *Lutzomyia almerioi* foi de 0,36%. No lote 20, a taxa de infecção foi de 0,51% (3/590), sendo de 0,42% (2/475) no peridomicílio e 1,27% (1/79) no intradomicílio.

A tentativa de cultivo em meios específicos dos protozoários encontrados nas 3 fêmeas de *Lutzomyia almerioi*, não obteve sucesso.

4.2.3.2 Métodos moleculares

Foram extraídos DNA de 1220 fêmeas dissecadas, sendo 808 de *Lutzomyia almerioi*, 399 de *Lutzomyia longipalpis* e 13 de *Nyssomyia whitmani*, distribuídas em 109 frascos contendo de uma a 50 fêmeas.

A distribuição das fêmeas dissecadas analisadas por PCR com os oligonucleotídeos S17 e S18, e o resultado obtido, conforme o local de captura, encontram-se na tabela 21. As respectivas taxas de infecção por *Leishmania* encontradas estão demonstradas na tabela 22.

Tabela 21 – Número de fêmeas dissecadas e encontradas infectadas pela PCR com oligonucleotídeos S17 e S18, segundo local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.

Local Espécies	L. 2 peri		L.19 peri		L.19 casa		L.19 mata		L.20 peri		L.20 casa		L.20 cultivo		L.20 gruta		L.20 mata		L.40 peri		L.56 gruta		L.60 peri		L.115 peri		Total	
	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf	Dis	Inf
<i>Lu. almerioi</i>	0	0	41	0	0	0	3	1	464	2*	73	1*	0	0	22	0	3	0	2	0	194	0	2	0	4	0	808	4
<i>Lu. longipalpis</i>	2	1	242	3	12	0	1	0	115	5	8	1	13	0	0	0	1	0	0	0	3	1	1	0	1	0	399	11
<i>Ny. whitmani</i>	0	0	3	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0
<i>Total</i>	2	1	286	3	12	0	5	1	588	7	81	2	13	0	22	0	4	0	2	0	197	1	3	0	5	0	1220	15

L. = lote
Dis = dissecadas
Inf = infectadas

* Na observação ao microscópio ótico, quando da dissecação das fêmeas no campo, uma fêmea capturada no peridomicílio e uma no domicílio do lote 20, já haviam sido observadas infectadas por flagelados.

Tabela 22 – Taxas de infecção natural por *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos pesquisadas por meio da PCR com os oligonucleotídeos S17 e S18, segundo local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.

Local	L. 2 peri %	L. 19 peri %	L. 19 mata %	L. 20 peri %	L. 20 casa %	L. 56 gruta %	Total %
Espécie							
<i>Lu. almerioi</i>	-	0,00 (0/41)	33,30 (1/3)	0,43 (2/464)	1,37 (1/73)	0,00 (0/194)	0,50 (4/808)
<i>Lu. longipalpis</i>	50,00 (1/2)	1,24 (3/242)	0,00 (0/1)	4,35 (5/115)	12,50 (1/8)	33,30 (1/3)	2,76 (11/399)
<i>Ny. whitmani</i>	-	0,00 (0/3)	0,00 (0/1)	0,00 (0/9)	-	-	0,00 (0/13)
Total	50,00 (1/2)	1,05 (3/286)	20,00 (1/5)	1,19 (7/588)	2,47 (2/81)	0,51 (1/197)	1,23 (15/1220)

peri = peridomicílio
L = lote

As PCR realizadas empregando-se os oligonucleotídeos para G6PD foram todas negativas. Nas reações com os oligonucleotídeos S4 e S12 foram encontradas 20 amostras positivas para tripanossomatídeos e com a “nested”-PCR (oligonucleotídeos S17/S18) confirmou-se a presença de 15 amostras positivas para *Leishmania*.

Considerando-se haver somente uma fêmea infectada em cada pool (PEREZ *et al.* 1994; MIRANDA *et al.* 2002), a taxa de infecção por *Leishmania* obtida por detecção molecular foi de 0,50% (4/808) em *Lutzomyia almerioi* e 2,76% (11/399) em *Lutzomyia longipalpis*.

As taxas de infecção natural dos flebotomíneos conforme a espécie de *Leishmania* encontram-se na tabela 23.

Tabela 23 – Taxas de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos pesquisadas por meio da PCR com oligonucleotídeos S17/S18, conforme a espécie de *Leishmania* e local de captura no Assentamento Guaicurus, 2002-2003.

Local Espécie	Lote 19 peri		Lote 19 mata		Lote 20 peri		Lote 20 casa		Lote 2 peri		Total		
	Dis.	Id.	Dis.	Id.	Dis.	Id.	Dis.	Id.	Dis.	Id.	Dis.	Id.	%
<i>Lu. almerioi</i>	41	0	3	1	464	2	73	1	0	0	808	4	0,50
<i>Lu. longipalpis</i>	242	3	1	0	115	2	8	1	2	1	399	7	1,75
<i>Ny. whitmani</i>	3	0	1	0	9	0	0	0	0	0	13	0	0,00
Total	286	3	5	1	588	4	81	2	2	1	1220	11	0,90
Infecção													
<i>L.(L.)chagasi</i>													
<i>Lu. almerioi</i>				1		1		1			808	3	0,37
<i>Lu. longipalpis</i>		1									399	1	0,25
<i>L.(L.) amazonensis</i>													
<i>Lu. longipalpis</i>		1				1		1		1	399	4	1,00
<i>L.(Viannia) sp</i>													
<i>Lu. almerioi</i>						1					808	1	0,12
<i>Lu. longipalpis</i>		1				1					399	2	0,50

Dis: Dissecadas
Id: Identificadas

Foram encontradas três fêmeas de *Lutzomyia almerioi* infectadas por *Leishmania (L.) chagasi* e uma infectada por *Leishmania (Viannia) sp*.

Entre as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, foram detectadas quatro infectadas por *Leishmania (L.) amazonensis*, duas por *L. (Viannia) sp* e uma por *L. (L.) chagasi*. Em quatro amostras de *Lu. longipalpis*, três capturadas

no peridomicílio do lote 20 e uma na gruta próxima do lote 56, não foi possível determinar, pelo seqüenciamento, a espécie de *Leishmania*.

O encontro de *Leishmania* (*Viannia*) nas amostras de cães e flebotomíneos será avaliado pelo uso de sonda com G6PD, para discriminar se o parasita é *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* ou outra espécie deste subgênero.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na presente investigação complementam informações sobre a epidemiologia das leishmanioses na área de estudo, inicialmente pesquisada por NUNES (2001), sobretudo em relação aos reservatórios domésticos e aponta para os seus possíveis vetores.

5.1 Inquérito dos animais domésticos

Os eqüinos (*Equus caballus*) têm sido encontrados infectados por *Leishmania* em áreas de transmissão de leishmaniose tegumentar americana (FALQUETO *et al.* 1987; AGUILAR *et al.* 1989; YOSHIDA *et al.* 1990; FOLLADOR *et al.* 1999; TOLEZANO 2000). O papel desses animais como possíveis reservatórios domésticos de *Leishmania (L.) chagasi*, também tem sido pesquisado (CERQUEIRA *et al.* 1999), em virtude da atração que exercem sobre os flebotomíneos, principalmente, *Lutzomyia longipalpis* que tem se adaptado ao ambiente doméstico e peridoméstico (XIMENES *et al.* 1999; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.* 2001; GALATI *et al.* 2003b).

No presente estudo, como já havia sido observado por NUNES (2001), não foram encontradas evidências clínicas ou sorológicas de infecção natural por *Leishmania* entre os eqüinos do Assentamento Guaicurus.

Todavia, cabe ressaltar as limitações diagnósticas da reação de imunofluorescência indireta, principalmente na LTA. Assim, a exemplo dos

resultados obtidos por TOLEZANO (2000) em creme leucocitário de eqüinos, uma nova investigação empregando técnicas moleculares poderia revelar uma outra realidade entre esses animais do Assentamento.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido considerado um importante reservatório de *Leishmania (L.) chagasi* em ambiente periurbano e urbano (BARBOSA-DE-DEUS *et al.* 2002), todavia, o papel deste animal no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar americana, até o momento, não está esclarecido (REITHINGER e DAVIES 1999).

A soroprevalência canina encontrada, 15,5% pela reação de imunofluorescência indireta e 31,0% pelo ensaio imunoenzimático é próxima às observadas nos estados da Bahia, São Paulo e Mato Grosso do Sul sendo de 23,5%, 26,3% e 24,0%, respectivamente (PARANHOS-SILVA *et al.* 1996; SANTOS *et al.* 1998; GALIMBERTTI *et al.* 1999). Cabe ressaltar que NUNES *et al.* (2001), na mesma região do presente estudo, relataram soroprevalência de 23,7%.

O quadro clínico foi variável entre os cães reagentes. A maioria apresentava-se aparentemente sadia, porém alguns animais mostraram emagrecimento acentuado, crescimento exagerado de unhas, ulcerações, secreções oculares, alopecia geral ou localizada, manifestações já verificadas em outros estudos (DEANE 1956; NUNES *et al.* 1988; GOMES *et al.* 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA 1997; NUNES *et al.* 2001).

O ensaio imunoenzimático detectou mais cães soro-reagentes do que a reação de imunofluorescência indireta, fato descrito anteriormente por vários autores (EVANS *et al.* 1990; PARANHOS-SILVA *et al.* 1996;

KANETO 2001; BARBOSA-DE-DEUS *et al.* 2002). Os resultados obtidos pela PCR no presente projeto reforçaram a maior sensibilidade do EIE em comparação com a RIFI, visto que o EIE reconheceu maior número de cães com infecção comprovada do que a RIFI. Cabe ressaltar que o EIE, também, reconheceu maior número de cães assintomáticos que estavam infectados por *Leishmania*, do que a RIFI.

O encontro da prevalência de cães reagentes mais elevada nas amostras de soro, tanto pela RIFI (15,5%) como no EIE (31,0%), quando comparada à dos eluatos sanguíneos (RIFI - 8,5% e EIE - 18,6%) está de acordo com as observações de EVANS *et al.* (1990); ZICKER *et al.* (1990) e BRAGA *et al.* (1998).

O nível de anticorpos detectáveis pelas técnicas sorológicas pode cair e até negatizar em cães comprovadamente infectados por *Leishmania*, cerca de 5 meses ou mais depois da infecção (PARANHOS-SILVA *et al.* 2003). Este fato, explicaria a ocorrência de 4 cães que haviam sido reagentes na primeira amostra de soro, pelo EIE ou RIFI ou ambas as técnicas e não reagentes na segunda amostra de soro, com PCR positiva, a exemplo do que foi encontrado por REITHINGER *et al.* (2002b).

No presente estudo, os métodos convencionais de demonstração do parasita não foram bem sucedidos, porém as técnicas moleculares permitiram a detecção do DNA de *Leishmania* e a identificação da espécie envolvida. Dentre os 20 animais com PCR positiva no aspirado de medula óssea, na cultura, em meio acelular, só foi possível isolar o parasita a partir de baço e fígado de hamsters inoculados com aspirado medular de 10 cães.

Dessas dez cepas isoladas, somente uma pode ser identificada, em virtude da contaminação ou da dificuldade de manter as promastigotas em quantidade suficiente para a identificação, que ocorreram nas demais cepas. A espécie de *Leishmania* identificada por anticorpos monoclonais, foi a mesma detectada, pelas técnicas moleculares, na maioria dos cães infectados.

A PCR tem-se mostrado sensível na detecção de DNA de *Leishmania* em amostras que foram negativas para o protozoário em cultura (TOLEZANO 2000). Uma das possíveis razões para isto seria a distribuição não homogênea dos parasitas no tecido, freqüentemente presente nos animais com baixa carga parasitária (PARANHOS-SILVA *et al.* 2003). Em amostras provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar na Venezuela, demonstrou-se que a PCR foi mais sensível do que a cultura e o exame dos esfregaços corados, detectando 80% dos casos comparados aos 42% e 72% obtidos, respectivamente (RODRIGUEZ *et al.* 2002). ASHFORD *et al.* (1995) sugerem que a PCR poderia servir como um melhor “gold standard” para definir infecção por *Leishmania* em cães do que a cultura ou inoculação em hamster.

A detecção do DNA de *Leishmania* foi maior em amostras de creme leucocitário do que em aspirado de medula óssea, resultado este que diverge do encontrado por outros autores. Em cães de áreas endêmicas de LTA no Peru foram detectadas por PCR taxas de positividade de 8,5 e 9% em creme leucocitário e 16,7 e 17,4% em aspirado de medula óssea (REITHINGER *et al.* 2000, 2003). FISA *et al.* (2001), em estudo realizado

em cães de área de leishmaniose visceral na Espanha, demonstrou que o uso de creme leucocitário, obtido do sangue periférico, na realização da PCR foi tão sensível e específico quanto os aspirados de medula óssea e linfonodo, enfatizando que este tem a vantagem de ser um material menos invasivo para a sua coleta.

A identificação da espécie de *Leishmania* (*Viannia*) por meio do seqüenciamento, das amostras de aspirado de medula e creme leucocitário de cães amplificadas por PCR, não foi possível, em virtude da existência de um alto grau de similaridade na seqüência de nucleotídeos do DNA ribossômico entre os organismos do subgênero *Viannia*. No entanto, considerando-se que os parasitas isolados de casos humanos, na região de estudo, foram identificados como *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (NUNES 2001) e que a distribuição geográfica dos demais parasitas desse subgênero associados a casos humanos de LTA está, até o momento, restrita à região norte do território nacional e sem relatos de infecção canina (DEDET 1993; SILVEIRA *et al.* 2002), existe forte indicação de que os cães pesquisados estavam infectados por essa espécie de *Leishmania*.

No Peru, foram identificados dois cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp, sendo que o parasita foi detectado a partir de material colhido de conjuntiva, pulmão, linfonodo, ovários e sangue (REITHINGER *et al* 2002a). Em áreas peruanas, onde *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana* são endêmicas, infecção natural por *Leishmania* (*Viannia*) em cães tem sido detectada em amostras de sangue total, creme leucocitário e aspirado de medula óssea (REITHINGER *et al* 2000).

A infecção natural por *Leishmania (V.) braziliensis* em cães, causando lesões no tegumento, tem sido descrita no Brasil (BARRETTO *et al.* 1984; FALQUETO *et al.* 1986; YOSHIDA *et al.* 1990; LONARDONI *et al.* 1993; VASCONCELOS *et al.* 1994; MADEIRA *et al.* 2003) e sua visceralização, já foi detectada em linfonodo de um cão no Rio de Janeiro (MARZOCHI *et al.* 1983). Assim, se confirmada a presença da *L. (V.) braziliensis* em cães no Guaicurus, amplia-se o relato da infecção por este parasita em cães brasileiros.

O presente encontro de *Leishmania (L.) amazonensis* em aspirado de medula óssea e creme leucocitário dos cães foi surpreendente, visto que esta espécie só foi relatada, recentemente, no Estado do Mato Grosso do Sul em seis casos humanos de LTA no município de Bela Vista (DORVAL *et al.* 2002). No entanto, a presença desse protozoário em aspirado de linfonodo já foi observada em dois cães no Estado de São Paulo (TOLEZANO 2000) e em casos humanos de leishmaniose visceral, na Bahia, nos quais o parasita foi isolado de aspirado de medula óssea (BARRAL *et al.* 1991).

A presente detecção de DNA de leishmânias dermatotrópicas no sangue periférico (creme leucocitário) de cães indica a possibilidade deste animal participar da cadeia de transmissão da LTA, atuando como fonte de infecção para a fêmea do flebotomíneo, quando do repasto sanguíneo, como tem sido proposto por REITHINGER *et al.* (2000). A alta prevalência de *Leishmania (Viannia)* em amostras de sangue e de medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos de área endêmica de *L. (V.) braziliensis*

e *L. (V.) peruviana*, no Peru, tem fornecido adicional evidência do provável papel deste animal como reservatório de LTA (REITHINGER *et al.* 2000; REITHINGER e DAVIES 2002).

Nunes (2001) diagnosticou 7 casos humanos de LTA por *L. (V.) braziliensis* em moradores do Assentamento e concluiu que o provável local de infecção era em áreas de mata externas ao Assentamento. Todavia, no presente projeto, a detecção de *Leishmania (Viannia) sp*, provavelmente *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* em cães domésticos e flebotomíneos, aponta para a possibilidade de transmissão destes dois agentes à população humana, do Assentamento Guaicurus. Salienta-se a importância do diagnóstico específico do parasita, uma vez que *L. (L.) amazonensis* está associada aos casos cutâneos difusos da doença (LAINSON e SHAW 1987).

O encontro de um cão co-infectado por *Leishmania (L.) chagasi* e *Trypanosoma evansi* demonstra a presença deste outro tripanossomatídeo no Assentamento Guaicurus, como já assinalada em outras áreas sul-matogrossenses (STEVENS *et al.* 1989; NUNES 1996). Tendo-se em vista que reações cruzadas podem ocorrer entre esses dois parasitas na sorologia, é possível que entre os cães reagentes, dos quais não foi possível colher material para tentativa de isolamento e/ou detecção de DNA do parasita, alguns poderiam estar infectados apenas pelo *Trypanosoma evansi*. Neste caso, a taxa de soroprevalência da leishmaniose encontrada estaria superestimada.

Entre os 19 cães encontrados com infecção natural por *L. (L.) chagasi*, 8 apresentavam-se assintomáticos, 6 oligossintomáticos e 5 polissintomáticos. Estudos sobre a infectividade dos cães para os flebotomíneos têm demonstrado que animais polissintomáticos são mais infectivos para o vetor, enquanto que cães assintomáticos representam uma fonte modesta de *L. (L.) chagasi* (SHERLOCK 1996; TRAVI *et al.* 2001). COURTENAY *et al.* (2002) observaram que somente 43% dos cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi* podem infectar os flebotomíneos e que não há relação entre a proporção de flebotomíneos infectados e o quadro clínico do cão.

Embora um cão tenha se mostrado menos atrativo à *Lutzomyia longipalpis* do que um cavalo, em estudo com iscas animais realizado no Assentamento Guaicurus (GALATI *et al.* 2003b), a presença de um maior número de cães em relação ao de eqüinos, sobretudo no peridomicílio, onde a frequência deste flebotomíneo tem sido registrada com maior intensidade (GALATI *et al.* 2003b), aliada ao hábito alimentar oportunista deste inseto (MORRISON *et al.* 1993), poderia levá-lo a se alimentar mais intensamente no cão, o que explicaria as elevadas taxas de prevalência da infecção canina encontradas no local.

Dentre os fatores que levaram ao estabelecimento da transmissão de leishmaniose visceral entre a população canina do Assentamento Guaicurus, discutidos por NUNES (2001), destacam-se as modificações ambientais provocadas pela ação predatória humana, principalmente pelos desmatamentos; dispersão, em virtude dessas alterações ambientais, do

reservatório natural do parasita, possivelmente, o lobo *Cerdocyon thous* animal abundante na região e que já foi encontrado naturalmente infectado por *L. (L.) chagasi* na Amazônia (LAINSON *et al.* 1969; SILVEIRA *et al.* 1982) e no Mato Grosso do Sul (MELLO *et al.* 1988); introdução de cães doentes, provenientes de outras cidades do Estado onde ocorre a parasitose, devido às migrações de trabalhadores rurais; construção das casas e seus anexos próximos às encostas e pés-de-serra, facilitando o contato dos vetores com os animais domésticos; falta de limpeza nos peridomícílios e em seus anexos propiciando ecótopos favoráveis à proliferação do vetor.

Ainda não foram relatados casos humanos de leishmaniose visceral no Assentamento Guaicurus¹ (NUNES 2001), quadro este semelhante ao observado por PARANHOS-SILVA *et al.* (1996), que relataram a ausência de casos humanos de LVA em alguns locais com alta soroprevalência de leishmaniose canina. Por outro lado, CUNHA *et al.* (1995) encontraram soroprevalência canina de 6,3% e observaram uma possível associação entre a infecção humana e a presença de cães dentro ou próximo da residência. Cabe salientar ainda, que em algumas áreas endêmicas a infecção canina precedeu os casos humanos da doença (SHERLOCK 1996; GALIMBERTI *et al.* 1999).

Apesar da ausência de casos de LVA no Assentamento Guaicurus, a elevada taxa de prevalência da infecção canina e altas densidades de populações de flebotomíneos potencialmente vetores em ambiente peri e intradomiciliar, como se verá mais adiante, parecem apontar para a

possibilidade de infecção por *L. (L.) chagasi* na população humana local. Embora, estudo de soroprevalência venha sendo desenvolvido nesta população¹, há que se atentar para o emprego de técnicas moleculares ou isolamento dos parasitas para a identificação dos mesmos, uma vez que foram três as espécies de *Leishmania* encontradas na área.

5.2 Inquérito sobre a fauna flebotomínea

A identificação das espécies de flebotomíneos que ocorrem em uma área endêmica de leishmaniose, das taxas de infecção por *Leishmania* e das espécies do parasita, auxiliam a compreender a epidemiologia da doença e a propor medidas para a sua prevenção e controle (ARANSAY *et al.* 2000; MICHALSKY *et al.* 2002).

A fauna flebotomínea encontrada no presente estudo foi muito parecida à descrita anteriormente para a região (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003a, 2003b), acrescida apenas de *Lutzomyia dispar*, da qual se capturou apenas um exemplar (tabela 11).

Entre os flebotomíneos capturados no período de outubro de 2002 a outubro de 2003, em armadilhas automáticas luminosas com e sem inseticida e armadilha de Shannon, no Assentamento Guaicurus, foi nítido o predomínio de *Lutzomyia longipalpis* (72,4%). A segunda espécie mais freqüente foi *Lutzomyia almerioi* (20,2%). Ambas responderam por cerca de 93,0% dos espécimes capturados. *Nyssomia whitmani* (2,8%) foi a terceira

¹ NUNES VLB. Comunicação pessoal. Campo Grande, UNIDERP, 2004.

espécie que apresentou maior frequência, porém bem distante das anteriores (tabela 11).

Quanto a sazonalidade, observou-se que as frequências mais elevadas foram nos meses de fevereiro e junho de 2003. Observando-se as médias geométricas de Williams no total de ecótopos estudados com armadilhas automáticas luminosas (tabela 15 e figura 22) percebe-se que *Lu. longipalpis* predominou no verão, quando ocorreram dois picos (dezembro/02 e fevereiro/03) e no inverno (julho de 2003). *Lu. almerioi* apresentou o mesmo comportamento, porém com pico bem mais discreto no inverno, ao contrário de *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani*, em todos os meses a média de fêmeas de *Lu. almerioi* foi maior que a de machos. *Ny. whitmani* foi freqüente no verão, porém predominou no inverno de 2003, chegando a “desaparecer” nos meses de maio e outubro do mesmo ano. O comportamento dessas três espécies assemelha-se ao já observado no Assentamento Guaicurus e outras áreas da Serra da Bodoquena (NUNES 2001; GALATI *et al.* 2003a, 2003b).

A maior diversidade das espécies (tabela 13) foi encontrada na mata do lote 19 (2,2) e do lote 20 (1,8), o que era esperado visto que as espécies de flebotomíneos são primitivamente de ambientes florestais. No peridomicílio dos lotes 19 e 20 foram encontradas, 10 e 8 espécies, respectivamente, sendo que no mesmo ambiente em outros lotes 3 a 7 espécies foram observadas. A menor diversidade das espécies foi encontrada no intradomicílio, a exemplo do que foi encontrado por MIRANDA *et al.* (2002).

Nas capturas realizadas quinzenalmente em CDC com inseticida (tabela 13), observou-se que além das três espécies mais freqüentes descritas anteriormente, foram encontradas nos intradomicílios amostrados, em baixíssimas densidades, ou seja, na maioria das vezes um espécime, *B. cunhai*, *B. brumpti*, *E. corumbaensis*, *P. shannoni*, *P. punctigeniculata*, *M. peresi*, *P. kuscheli*, *S. sordellii*, o mesmo ocorreu no peridomicílio, onde além destes, dois espécimes de *M. oliveirai* e um de *B. avellari* foram observados. O encontro de espécies mais associadas ao ambiente florestal, em número bastante reduzido, em ambientes que sofreram a ação antrópica, deve-se provavelmente ao fato desses ambientes estarem muito próximos das matas, o que freqüentemente ocorre no Assentamento Guaicurus.

As taxas de infecção natural por *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos encontradas em áreas endêmicas de LTA, geralmente, são baixas, como as observadas no Brasil, nos Estados do Ceará, 0,8% e 0,32% (AZEVEDO e RANGEL 1991; QUEIROZ *et al.* 1994), Bahia, 0,4% e 0,52% (RYAN *et al.* 1990; MIRANDA *et al.* 2002), Mato Grosso do Sul, 0,15% (GALATI *et al.* 1996), São Paulo, no início da década de 40, 0,24% (PESSOA e COUTINHO 1941) e mais recente, 0,22% (CASANOVA *et al.* 1995), Minas Gerais, 0,13% (RANGEL *et al.* 1985), Paraná, 0,15% (LUZ *et al.* 2000) e Rio Grande do Sul, 0,33% (SILVA e GRUNEWALD 1999).

O mesmo fato tem ocorrido em outros países americanos, onde taxas de 0,06% e 0,14% (PEREZ *et al.* 1991, 1994) foram obtidas no Peru, 0,16% no Paraguai (HASHIGUCHI *et al.* 1992) e na Venezuela 0,19% no

Estado de Carabobo (RODRIGUEZ *et al.* 1999) e 1,09% no Estado de Miranda (FELICIANGELI *et al.* 1994).

As taxas de infecção por *Leishmania*, conforme a espécie de flebotomíneo encontrada naturalmente infectada, em algumas dessas áreas endêmicas de LTA variaram como as descritas na Venezuela, 1,19% em *Lu. ovallesi*, 0,47 e 0,29% em *Lu. gomezi*, 0,43% em *Lu. panamensis* (FELICIANGELI *et al.* 1994; RODRIGUEZ *et al.* 1999); no Peru, 0,16% em *Lu. peruensis* e 0,13% em *Lu. verrucarum* (PEREZ *et al.* 1994); no Paraguai, 0,38% em *Ny. whitmani* (HASHIGUCHI *et al.* 1992) e no Brasil, 0,47% em *Ny. whitmani* e 0,06% em *Lu. migonei* no Estado do Ceará (QUEIROZ *et al.* 1994), 0,6% em *Lu. pessoai* e 0,8% em *Lu. misionensis* no Rio Grande do Sul (SILVA e GRUNEWALD 1999) e 0,24% em *Ny. neivai* em São Paulo (CASANOVA *et al.* 1995).

Em áreas endêmicas de leishmaniose visceral americana, taxas de infecção natural por *Leishmania* obtidas em flebotomíneos foram de 0,59% na Colômbia (CORREDOR 1989), 0,15% em *Pintomyia (Pifanomyia) evansi* e 0,28% em *Lu. longipalpis* na Venezuela (FELICIANGELI *et al.* 1999), 0,2% no Estado da Bahia (SHERLOCK 1996), 0,39% no Estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS *et al.* 1998) e 7,14% no Estado do Pará, Brasil (LAINSON *et al.* 1985).

No presente estudo, a taxa de Infecção natural por flagelados encontrada em fêmeas de flebotomíneos pela dissecação, 0,22% (tabela 20), assemelha-se àquelas anteriormente descritas para áreas endêmicas de leishmanioses no Brasil, no entanto com o emprego de técnicas moleculares

a taxa de infecção por *Leishmania* elevou-se para 1,23% (tabela 22), em virtude da alta sensibilidade da PCR que possibilitou a detecção do parasita, ou pelo menos do seu DNA, no flebotomíneo. Acresce que esta taxa pode ainda estar subestimada, uma vez que em oito “pools” positivos, haviam de 2 a 7 fêmeas, tendo sido considerado como sendo somente uma fêmea positiva.

Ao comparar as taxas de infecção encontradas pela PCR (tabelas 21 e 22), por local de captura das fêmeas, observa-se que taxas muito próximas ocorreram no lote 19 (1,32% - 4/303) e lote 20 (1,27% - 9/708) e na gruta situada próximo ao lote 56 foi menos que a metade (0,51%) das anteriores. As altíssimas taxas encontradas no lote 2, na mata do lote 19, bem como em *Lutzomyia longipalpis* no intradomicílio do lote 20 e da gruta, sofreram influência do número muito reduzido de fêmeas investigadas.

Lutzomyia longipalpis é a principal espécie vetora de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* na América (LAINSON *et al.* 1985; DEDET 1993; SHERLOCK 1994), com algumas exceções, tais como: em focos de leishmaniose visceral, na Colômbia, onde se atribui, também, a *Pintomyia* (*Pifanomyia*) *evansi* (Nuñez-Tóvar, 1924) a transmissão da doença (TRAVI *et al.* 1996) e na Venezuela, onde se detectou a infecção natural desta espécie por *L. (L.) chagasi* (FELICIANGELI *et al.* 1999). Já, em duas cidades do Mato Grosso do Sul, suspeita-se que *Lutzomyia cruzi* atue na transmissão, por evidência epidemiológica (GALATI *et al.* 1997) e pelo encontro de infecção natural neste flebotomíneo pela *L. (L.) chagasi* (SANTOS *et al.* 1998).

No presente trabalho observou-se, por métodos moleculares, que a taxa de infecção por *Leishmania* em *Lu. longipalpis* foi alta (2,76%), sendo sete vezes maior aquela obtida por SANTOS *et al.* (1998) para *Lu. cruzi*, em área de transmissão de LVA no Estado de Mato Grosso do Sul.

Além de *L. (L.) chagasi* (0,3%), *Lu. longipalpis* também foi encontrada infectada naturalmente por *L. (L.) amazonensis* (1,0%) e *L. (Viannia) sp* (0,5%), espécies associadas a LTA. Esse encontro é corroborado com estudos de infecção experimental em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, nos quais se demonstrou que estas se infectam com *Leishmania (L.) amazonensis* (37%), *L. (L.) chagasi* (13%) e *L. (V.) braziliensis* (9%) (DA SILVA *et al.* 1990). A capacidade de *Lu. longipalpis* transmitir *L. (L.) amazonensis* para hamsters foi demonstrada por SHERLOCK (1996), sugerindo que também possa transmitir este parasita para outros hospedeiros vertebrados, inclusive para a população canina.

O predomínio de *Lutzomyia longipalpis* no peridomicílio e a elevada taxa de infecção natural por *Leishmania* encontrada, 4,35% no peridomicílio do lote 20 e 1,24% no peridomicílio do lote 19, ou seja, cerca de onze vezes e três vezes mais elevadas, respectivamente, que a taxa obtida por SANTOS *et al.* (1998), parece ser um forte indicativo de que esta espécie possa estar transmitindo os parasitas entre a população canina do Assentamento Guaicurus.

A impossibilidade no presente estudo de caracterizar quatro “pools” de *Lutzomyia longipalpis*, provenientes do peridomicílio do lote 20 e da gruta, aponta para a necessidade de repetição do sequenciamento, após

nova purificação do produto de PCR, bem como a utilização de sonda G6PD para discriminar *L. (V.) braziliensis* dentre os outros organismos do subgênero *Viannia* encontrados em amostras caninas e em fêmeas de flebotomíneos.

Nyssomyia whitmani é uma espécie antropofílica, que atua como vetora de LTA no Brasil e no Paraguai (AGUIAR *et al.* 1989; AZEVEDO e RANGEL 1991; GOMES 1992; HASHIGUCHI *et al.* 1992; GALATI *et al.* 1996; LUZ *et al.* 2000; MIRANDA *et al.* 2002). No presente estudo não foi observada infecção natural nesta espécie, provavelmente, pelo pequeno número de fêmeas pesquisadas (13 espécimes), apesar de que VEXENAT *et al.* (1986) também não encontraram a infecção entre 1832 fêmeas pesquisadas, em área endêmica de LTA, onde *Ny. whitmani* parece atuar como vetora. De acordo com a taxa de infecção natural obtida por GALATI *et al.* (1996), em *Ny. whitmani* (0,16%) em outra área do Estado de Mato Grosso do Sul, seria necessário pesquisar cerca de 625 fêmeas para encontrar uma infectada.

Lutzomyia almerioi pertence ao mesmo grupo monofilético de *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, esta última, também com suspeitas de transmitir a LVA no Estado do Mato Grosso do Sul (GALATI *et al.* 1997). Essa espécie tem apresentado elevada densidade populacional, em cavernas da Província Espeleológica da Bodoquena (GALATI *et al.* 2003a), onde existem mamíferos silvestres (COSTA e SEGOND 1992) que podem atuar como reservatórios de *Leishmania* naquela região. É uma espécie altamente antropofílica, com atividade noturna e diurna e foi observada com

infecção natural por flagelados na fazenda Pitangueiras, município de Bonito, MS (GALATI *et al.* 1999; NUNES 2001).

Nos últimos anos, têm-se observado a intensificação do ecoturismo para a região sudoeste do Estado de Mato Grosso do Sul, principalmente, para as áreas de cavernas e de rios que cortam o Planalto da Bodoquena, assim, torna-se importante um planejamento cuidadoso dessas atividades para a região (GALATI *et al.* 1999, 2003a).

No presente trabalho, foram encontrados no lote 20, três espécimes de *Lu. almerioi*, observados ao microscópio, infectados naturalmente por flagelados, um deles capturado dentro de casa (1,27% e 1,37% por PCR) em dormitório e outros dois no peridomicílio (0,42% e 0,43% por PCR), um capturado em horário noturno e o outro pela manhã. A caracterização molecular do DNA do parasita de duas dessas fêmeas e de uma capturada na mata do lote 19, demonstrou tratar-se de *Leishmania (L.) chagasi* (0,37%). Uma das fêmeas de *Lu. almerioi* infectada por flagelados, capturada no peridomicílio do lote 20, foi negativa na PCR, isto pode ter sido por haver pouquíssimos parasitas, os quais não foram detectados ou então, a infecção ser por outro flagelado e não *Leishmania*, a exemplo do que foi encontrado por RODRIGUEZ *et al.* (1999), que entre 65 fêmeas observadas com flagelados, somente 5 tinham infecção por *Leishmania*.

Além de *L. (L.) chagasi*, detectou-se, por técnicas moleculares, uma fêmea de *Lu. almerioi* com infecção natural por *Leishmania (Viannia) sp* (0,12%), provavelmente *Leishmania (V.) braziliensis* agente associado, até o

momento, a maioria dos casos de LTA que ocorrem no Estado de Mato Grosso do Sul.

O presente estudo constitui-se no primeiro relato de infecção natural confirmada de *Lu. almerioi* por *L. (L.) chagasi* e *L. (Viannia) sp*, esses achados colaboram com a possibilidade desta espécie, também, atuar como vetora de leishmanioses naquela região. A ocorrência, no ano de 2002, de um caso de LTA em um morador do lote 20¹, reforça a suspeita da participação de *Lu. almerioi* na transmissão dessa doença em Guaicurus, pois neste lote fêmeas deste flebotomíneo (tabelas 20 e 21) foram capturadas com frequência elevada no peri (475 espécimes) e intradomicílio (79 espécimes).

A detecção de DNA de *Leishmania* não conclui que uma espécie de flebotomíneo seja vetora, desde que não é possível distinguir pela PCR entre a presença de amastigotas de *Leishmania* provenientes de um repasto sanguíneo em animal infectado, da forma promastigota, que se desenvolve no intestino do vetor e é infectante para o hospedeiro (ARANSAY *et al.* 2000). Acresce que para um flebotomíneo atuar como vetor dependerá de sua capacidade de manter o desenvolvimento do parasita e de transmiti-lo (KILLICK-KENDRICK 1990). Portanto, esses aspectos ainda necessitam ser demonstrados para indicar *Lu. almerioi* como vetora das leishmânias nela encontradas.

MIRANDA *et al.* (2002) demonstrou que há heterogeneidade na distribuição espacial de flebotomíneos infectados em uma área endêmica de

¹ NUNES VLB. Comunicação pessoal. Campo Grande, UNIDERP, 2004.

LTA na Bahia. No presente trabalho, o fato da maior densidade de flebotomíneos ter sido encontrada (86% dos espécimes capturados) nos lotes 19 e 20 e a maioria das fêmeas infectadas pela *Leishmania* serem provenientes destes dois sítios de captura, são aspectos sugestivos de que esta área, a noroeste do Assentamento, oferece maior risco de transmissão de leishmanioses. Todavia, há que se ter presente, que o número de fêmeas investigadas para a infecção natural por *Leishmania* foi bem mais reduzido nos demais pontos, em virtude das capturas pouco rendosas.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, não foram encontradas evidências clínicas e nem sorológicas de infecção natural por *Leishmania* entre os eqüinos (*Equus caballus*) do Assentamento Guaicurus.

A prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* encontrada nas amostras de soro dos cães do Assentamento Guaicurus foi de 15,5% pela reação de imunofluorescência indireta e 31,0% pelo ensaio imunoenzimático.

O ensaio imunoenzimático detectou mais cães reagentes do que a reação de imunofluorescência indireta, sendo que a prevalência de anticorpos foi mais elevada nas amostras de soro, quase o dobro, do que nos eluatos sanguíneos, em ambas as técnicas.

As técnicas moleculares permitiram a detecção do DNA de *Leishmania* em amostras de creme leucocitário e aspirado de medula óssea de cães do Assentamento Guaicurus, sendo encontrado animais infectados por *Leishmania* (L.) chagasi, *Leishmania* (Viannia) sp e *Leishmania* (L.) amazonensis.

A fauna flebotomínea encontrada nos vários ambientes do Assentamento Guaicurus, tais como gruta, mata, peri e intradomicílio foi semelhante, provavelmente pela proximidade desses ambientes.

Observou-se nítido predomínio de *Lu. longipalpis* (72,4%), seguida por *Lutzomyia almerioi* (20,2%) e *Nyssomia whitmani* (2,8%) em todos os ambientes.

A maior diversidade de espécies de flebotomíneos foi encontrada nas matas.

O maior número de espécimes foi capturado nos meses de fevereiro de 2003 e junho de 2003. *Lu. longipalpis*, *Lu. almerioi* e *Ny. whitmani* predominaram no verão. *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* também apresentaram pico no inverno.

A taxa de Infecção natural por flagelados encontrada em fêmeas de flebotomíneos pela dissecação, 0,22%, foi cerca de seis vezes menor a obtida pelo emprego de técnicas moleculares (1,23%).

A maior taxa de infecção ocorreu no lote 19 (1,32%), seguido pelo lote 20 (1,27%) e pela gruta (0,51%) próxima ao lote 56.

Lutzomyia longipalpis foi encontrada infectada naturalmente, por métodos moleculares, por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia)*, estas duas últimas associadas a LTA.

O predomínio de *Lutzomyia longipalpis* no peridomicílio e a elevada taxa de infecção encontrada (2,76%) indicam que esta espécie possa estar transmitindo os parasitas entre a população canina do Assentamento Guaicurus.

Identificou-se, pela primeira vez, a infecção natural de *Lu. almerioi* por *L. (L.) chagasi* e *L. (Viannia)* sp, o que sugere a possibilidade desta espécie, também, atuar como vetora de leishmanioses na região.

Observou-se ampla distribuição espacial dos flebotomíneos pelo Assentamento Guaicurus, porém em alguns locais com densidades bem reduzidas. A maior densidade foi encontrada nos lotes 19 e 20, bem como a maioria das fêmeas infectadas pela *Leishmania*.

A detecção de *Leishmania (L.) chagasi*, *Leishmania (Viannia)* sp e *Leishmania (L.) amazonensis* em cães domésticos e flebotomíneos aponta para a possibilidade de ocorrência também da infecção humana por esses agentes no Assentamento Guaicurus. A proximidade dos diversos ambientes amostrados dificultou a identificação dos prováveis locais de transmissão das leishmanioses.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar CM, Fernandez E, Fernandez R, Deane LM. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: the role of domestic animals. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79: 181-95.

Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, Vargas Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1989; 84: 19-28.

Alvarenga SM, Brasil AE, Del'Arco DM. **Geomorfologia**. In: **Ministério das Minas e Energia Secretaria-Geral**. Projeto RADAMBRASIL: levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro: MME; 1982. p. 125-84.

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66(5): 1933-38.

Araujo FG, Mayrink W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II- Studies on the specificity of the test. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1968; 10: 41-5.

Araujo Filho NA, Coura JR, Reis VLL. Leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. III. Reservatórios silvestres e comensais. **Rev Soc Bras Med Trop** 1981a; 14: 153-61.

Araujo Filho NA, Coura JR, Reis VLL. Leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. IV. Reservatórios domésticos. **Rev Soc Bras Med Trop** 1981b; 14: 163-9.

Arias JR, Beltrán F, Desjeux P, Walton B. **Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio.** Washington (DC); 1996. (OPAS – Cuaderno Técnico, 44).

Arruda W, Costa FC, Nahas S, Rosenfeld G. Leishmaniose visceral. **Bras Méd** 1949; 63:64-5.

Ashford DA, Badaró R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, David JR. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 1993; **48**(1): 1-8.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker Jr RH, Badaro R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 1995; 53(3): 251-5.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol** 2000; 30: 1269-81.

Azevedo ACR, Rangel EF. A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae: Phebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86: 405-10.

Badaró R, Reed SG, Carvalho, EM. Immunofluorescent antibody test in American leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg** 1983; 32(3): 480-4.

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis** 1986; 154: 639-49.

Badaró R. Current situation for leishmaniasis in Brazil. **Proceedings of the International Workshop on control Strategies for Leishmaniasis**. Boca Raton, FL: CRC Press, IDRC-CRDI: B 1-5; 1987.

Barbosa W, Silva RM, Borges PC. Informe preliminar sobre a leishmaniose tegumentar em Goiás. **Rev Goiana Med** 1965; 11: 1-9.

Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CA. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol** 2002; 9(6): 1361-6.

Barbosa-Santos EG, Marzochi MC, Urtado W, Queiros F, Chicarino J, Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1994; 89(2): 217-20.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr.G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg** 1991; 44(5): 536-46.

Barretto AC, Cuba CC, Vexenat JÁ, Rosa AC, Marsden PD, Magalhães AV. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. II Leishmaniose canina. **Rev Soc Bras Med Trop** 1984; 17: 59-65.

Bittencourt AL, Sodré A, Andrade ZA. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1968; 10: 247-52.

Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, Figueiredo JFC, Silva GF, Cimerman S, Bacha HÁ, Teixeira MCL. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32: 713-9.

Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu MML, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, Lima JWO. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororeagentes por imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororeagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev Soc Bras Med Trop** 1998; 31(5): 419-24.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2003; 97(3): 291-6.

Bray RS, Lainson R. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1965; 59: 535- 44.

Cabrera OL, Munsterman LE, Cardenas R, Gutierrez R, Ferro C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. **Biomédica** 2002; 22: 296-302.

Camargo ME, Rebonato C. Cross - reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **Am J Trop Med Hyg** 1969; 18: 500-5.

Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) infection in the Valley of Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. **Bol Dir Malariol San Amb** 1995; 35 Suppl 1: 77-84.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol** 2003; 41(2): 540-46.

Cerqueira E JL, Sherlock IA, Nakatami M, Badaró R. Dados preliminares sobre o papel dos eqüídeos na ecologia da leishmaniose visceral. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Suppl 1: 228.

Chagas E, Chagas AW. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral americana em Mato Grosso. **Hospital** 1938; 13: 471-80.

Chiari CA, Mayrink W, Magalhães PA. Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

Rev Inst Med Trop São Paulo 1973; 15: 298-303.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, De Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Pelaez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colômbia. **Am J Trop Med Hyg** 1989; 40(5): 480-6.

Costa CHN, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J Infect Dis** 2000; 182: 997-1000.

Costa NMC, Second CR. Plano de manejo ecológico como forma de gestão de unidades de conservação – Bodoquena: um estudo de caso. **Rev Bras Geogr** 1992; 54: 5-26.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis** 2002; 186: 1314-20.

Coutinho SG, Marzochi MCA, Souza WJS, Amendoeira MRR. Leishmaniose tegumentar americana. **J Bras Med** 1981; 41: 104-18.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1985; 80: 17-22.

Cunha S, Freire M, Eulalio C, Cristovão J, Netto E, Johnson. WD Jr, Reed SG, Badaro R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1995; 89(2): 155-8.

Da Silva AL, Williams P, Melo MN, 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** 1990; 85(4): 453-8.

Deane LM. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará.** São Paulo; 1956. [Tese de Livre-Docência – Universidade de São Paulo].

Dedet JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. **Anna Inst Pasteur actualités** 1993; 4(1): 3-25.

Dias ES, Falcão AL, Silva JE. Notes on the sand fly (Diptera: Psychodidae) in the State of Rio Grande do Sul. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1997; 92(3): 329-32.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araujo FG, Coelho MV, Williams P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I - Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1977; 19: 403-10.

Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC. Primeiro relato da ocorrência de *Leishmania amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2002; 35 Suppl 3: 220.

Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 1964; 13: 525-9.

Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am J Trop Med Hyg** 1990; 42(2):118-23.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Jr. G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81: 155-63.

Falqueto A, Varejao JB, Sessa PA. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic área in the state of Espírito Santo, Brazil.

Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82(3): 443.

Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzman B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. **Med Vet Entomol** 1994; 8(4): 317-24.

Feliciangeli MD, Rodriguez N, De Guglielmo Z, Rodriguez A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. **Parasite** 1999; 6(2): 113-20.

Ferreira E, Lucena S, Fonseca G, Barbosa TC, Aquino RB, Lambert JS, Nogueira AS. Visceral leishmaniasis in a Brazilian child infected perinatally with human immunodeficiency virus. **Pediatr Infect Dis J** 2001; 20(2): 224-6.

Ferreira MS. A síndrome da imunodeficiência adquirida e as doenças endêmicas no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996; 29: 531-5.

Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focua of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol** 1995; 32(5): 618-29.

Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Vet Parasitol** 2001; 99(2): 105-11.

Follador I, Araujo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC, Bittencourt A, Carvalho EM. Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32(5): 497-503.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1972; 6: 255-61.

Forattini OP. **Entomologia médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.** 4º v. São Paulo; Edgard Blücher Ltda; 1973.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1973; 7: 181-4.

Furtado T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol** 1980; 55: 81-6.

Galati EAB, Rego Jr. F de A , Nunes VLB, Teruya E. Fauna flebotomínica do Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyia forattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Rev Bras Entomol** 1985; 29: 261-6.

Galati EAB, Nunes VLB, Oshiro ET, Rego Jr. F de A. Nova espécie de Phlebotominae, *Lutzomyia corumbaensis*, sp. n. (Diptera, Psychodidae) do complexo *Lutzomyia cortelezzii*. **Rev Bras Entomol** 1989; 33: 465-75.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1996; 30: 115-28.

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. F de A, Oshiro ET, Chang MR. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1997; 31: 378-90.

Galati EAB, Nunes VLB. Descrição de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Bras Entomol** 1999; 43: 277-85.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Boggiani PC, Shaw JJ, Cristaldo G, Da Rocha HC, Andrade RMG, Casanova C, Naufel G. Ecological aspects of the phlebotomine fauna from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. In: **Third International Symposium on Phlebotomine Sandflies**; 1999 aug 23 – 27; Montpellier France. Abstracts, p.36.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Gonçalves-Andrade RM, Naufel G. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; 96: 641-7.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003.

Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Da Rocha HC, Oshiro ET, Gonçalves-de-Andrade RM, Naufel G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev Bras Entomol** 2003a; 47(2): 283-96.

Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Da Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Patol Trop** 2003b; 32(2): 235-61.

Galimbertti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI, Araujo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Barbosa JER, Tolezano JE, Pinto PLS. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Suppl 1: 217.

Gomes AC, Coutinho SG, Paim GV, Oliveira SMO, Galati EAB, Nunes MP, *et al.* Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1990; 32: 105-15.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **An Bras Dermatol** 1992; 67: 55-60.

Gomes AC. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1994; 89: 457-60.

Gomes AC, Silva AR, Costa CHN, Scherlock I, Costa JML, Shaw J, *et al.* **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): normas técnicas.** Brasília (DF): Fundação Nacional da Saúde, 1996.

Gomes AC, Costa CHN, Costa JML, Vieira JBF, Lima JWO, Dietze R. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001; 34: 223-28.

Grimaldi Jr.G, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **Am J Trop Med Hyg** 1987; 36: 270-87.

Grimaldi Jr.G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev** 1993; 6(3): 230-50.

Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EA, Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, Toma HK, Lima JH, Romanha AJ, Campbell DA. Characterization of *Leishmania* sp strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Trop** 2000; 74(1): 89-93.

Guimarães MCS, Giovannini VL, Camargo ME. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1974; 16: 145-8.

Guimarães MCS, Castilho EA, Celeste BJ, Nakahara OS, Netto VA. Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM em papel filtro para su uso em encuestas seroepidemiologicas de enfermedades parasitarias. **Bol Of Sanit Panam** 1986; 100 (2): 129-43.

Haddow AJ. Studies on the biting-habits of African mosquitos. An appraisal of methods employed with special reference to the twenty-four catch. **Bull Entomol Res** 1954; 45: 199-242.

Haddow AJ. Studies on the biting habits and medical importance of East African mosquitoes in the genus *Aedes*. I- Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. **Bull Entomol Res** 1960; 50: 759-79.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp.Ser.** 1999; 41: 95-8.

Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14: 229-43.

Hashiguchi Y, Chiller T, Inchausti A, De Arias A, Kawabata M, Alexander JB. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol** 1992; 86(2): 175-80.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. **Lancet** 1999; 354: 1191-99.

Herrer A, Christensen HA. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. **Am J Trop Med Hyg** 1976; 25: 59-63.

Iversson LB, Camargo ME, Villanova A, Reichmann MLAB, Andrade EA, Tolezano JE. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do Município de São Paulo, Brasil (1979-1982). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1983; 25: 310-7.

Jacobson RL. *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) – a perplexing parasite. **Folia Parasitol** 2003; 50: 241-50.

Kaneto CN. **Aspectos da transmissão da leishmaniose visceral no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo.** São Paulo; 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

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

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1969; 63: 741-5.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1970; 64: 654-57.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RSM, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil: XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1985; 79(2): 223-6.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W, Killick-Kendrick R, editors. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987.

Lainson R, Shaw JJ , Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EAY. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Ann Parasitol Hum Comp** 1990; 65(5-6): 282-4.

Lainson R, Shaw JJ , Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniases of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1994; 89: 435-43.

Leopoldo e Silva R, Corrêa FMA, Gomes AC, Yoshida ELA. Investigação epidemiológica sobre leishmaniose tegumentar americana no Município de Conchas, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Ciênc Bioméd** 1984; 5: 49-55.

Lonardoni MVC, Teodoro U, Arraes SMAA, Silveira TGV, Bertolini DA, Ishikawa EAY, Shaw JJ. Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev Saúde Pública** 1993; 27: 378-9.

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **Am J Trop Med Hyg** 1993; 49(3): 348-56.

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Parana state, southern Brazil. **Ann Trop Med Parasitol** 2000; 94(6): 623-31.

Machado-Coelho GLL, Vitor RWA, Chiari CA, Antunes CMF. Validity of serology for American trypanosomiasis with eluates from filter paper. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1995; 90(1): 59-64.

Madeira MMF, Uchoa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, Barrientos Serra CM. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Rev Soc Bras Med Trop** 2003; 36(5): 551-5.

Magalhães Rocha NM, Melo MN, Babá EH, Dias M, Michalick MSM, Costa CA, Williams P, Mayrink W. *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1988; 82: 68.

Mancianti F, Gradoni L, Gramieri S, Marconcini A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba. **Trop Med Parasitol** 1986; 37: 110-12.

Manson-Bahr PEC. Diagnosis, p 703-729. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Vol 2, London: Academic Press; 1987.

Marzochi MCA, Grimaldi Jr. G, Momen H, McMahon-Pratt D. Visceral *Leishmania braziliensis braziliensis* infection in a dog in Rio de Janeiro (Brazil). In: Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 10ª, Caxambu, 1983. **Resumos**. Belo Horizonte, CNPq, 1983. p.15.

Marzochi MCA, Souza WJS, Coutinho SG, Toledo LM, Grimaldi Jr G, Momen H. Evaluation of diagnostic criteria in human and canine mucocutaneous leishmaniasis in a Rio de Janeiro District where *Leishmania braziliensis braziliensis* occurs. In: Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 9ª, Caxambu, 1982. **Resumos**. Belo Horizonte, CNPq, 1982. p.63.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J Bras Med** 1992; 63(5/6): 82-104.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública** 1994; 10 Suppl 2: 359-75.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol Today** 1994; 10: 37-40.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1980; 22: 149 - 55.

Mello DA, Rego Jr.FA, Oshiro E, Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988; 83: 259.

Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988; 83: 347-55.

Menezes Filho JF, Barros RMG, Silva AL, Mambelli M, Silva PG. Leishmaniose cutâneo-mucosa ou tegumentar americana. Revisão da literatura e caso clínico. **Odontol Mod** 1986; 13: 32-42.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2002; 44(5): 255-9.

Migone LE. Um caso de kalazar a Assuncion (Paraguai). **Bull Soc Pathol Exot** 1913; 6:118-20.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CENEPI). **Guia de controle da leishmaniose tegumentar americana**. 3ªed. Brasília, 1994.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CENEPI). **Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil**. Brasília, 2002a.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral (calazar). Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980-2001**. [“on line”, 04/ 09/ 2002b, disponível em <http://www.funasa.gov.br/epi>].

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Neto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polimerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(2): 185-8.

Monteiro PS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994; 27 Supl 3: 67-72.

Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg** 1993; 49(1): 68-75.

Nascimento MDSB. Leishmaniose tegumentar no Estado de Goiás: análise dos dados epidemiológicos, clínicos e imunopatológicos da infecção humana, registrados de 1965 a 1984. **Rev Patol Trop** 1986; 15: 99-214.

Natal D, Marucci D, Reis IM, Galati EAB. Modificações da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). **Rev Bras Entomol** 1991; 35: 697-700.

Nunes VLB, Yamamoto YI, Rego Jr. F de A, Dorval MEC, Galati EAB, Oshiro ET, Rodrigues M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesq Vet Bras** 1988; 8: 17- 21.

Nunes VLB, Oshiro ET, Dorval MEC, Espíndola MA, Cristaldo G, G, Rocha HC *et al.* Estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar (LT) no Município de Corguinho, Mato Grosso do Sul: estudos de reservatórios, 1992-1994. **Rev Bras Parasitol Vet** 1994; 3: 29-45.

Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Arão LB, Hans Filho G, Espíndola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Serafini LN, Santos D. Estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar (LT) no Município de Corguinho, Mato Grosso do Sul. Estudos na população humana. **Rev Soc Bras Med Trop** 1995; 28: 185-93.

Nunes VLB. Protozoários tripanosomatídeos encontrados em animais domésticos e silvestres em área do Planalto e do Pantanal Sul-mato-grossense. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1996; 91 Suppl 27.

Nunes VLB. **Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998-1999.** São Paulo; 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Nunes VLB, Galati EAB, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ESMM, Ishikawa E, Camargo MCGO, D'Auria SRN, Cristaldo G, Rocha HC. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado do Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001; 34: 299-300.

Oliveira AC. Um caso de leishmaniose visceral americana. **Hospital** 1938; 13: 465-70.

Oliveira AG. **Estudo da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae), na zona urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000.** Rio de Janeiro; 2000. [Dissertação de Mestrado – Fundação Instituto Oswaldo Cruz].

Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. **Manual de controle da leishmaniose visceral.** Brasília, 1997.

Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 2001; 65(5): 510-17.

Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr G, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg** 1996; 55(1): 39-44.

Paranhos-Silva M, Oliveira GGS, Reis EA, Menezes RMC, Fernandes O, Sherlock I, Gomes RBB, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WLC. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in presence or absence of sand fly saliva. **Vet Parasitol** 2003; 114(2): 97-111.

Perez JE, Villaseca P, Cáceres A, Lopez M, Zolessi A, Campos M, Guerra H, Llanos-Cuentas. *Leishmania (Viannia) peruviana* isolated from the sandfly *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) and sentinel hamster in the Huayllacallán valley (Ancash, Peru). **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1991; 85: 60.

Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1994; 88: 161-4.

Pessôa SB, Coutinho JO. Infecção natural e experimental dos flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. **Hospital** 1941; 20: 25-35.

Pessoa SB, Barreto MP. **Leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1948.

Pessoa SB, Martins A. **Parasitologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Peterson NE, Vexenat A, Rosa AC, Lago PRL. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988; 83 Suppl 1: 39.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MCA, Nunes MP, Grimaldi Jr G. Canine American leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1988; 38: 52-8.

Queiroz RG, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Pessoa FA, Sousa RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. **Am J Trop Med Hyg** 1994; 50(6): 693-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology** 2001; 122: 253-61.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in as endemic area of cutaneous leishmaniasis of Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79(3): 395-6.

Rangel EF, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Alem Paraiba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1985; 80(3): 373-4.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61(4): 530-41.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp in dog blood and bone marrow. **J Clin Microbiol** 2000; 38(2): 748-51.

Reithinger R, Davies CR. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2002; 96 Suppl 1: 123-6.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, Gonzalez JS, Davies CR. *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2002a; 96(1): 76-8.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J Clin Microbiol** 2002b; 40(7): 2352-6.

Reithinger R, Espinoza CJ, Courtenay O, Davies CR. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol** 2003; 41(4): 1486-93.

Roberts DR, Hsi BP. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. **Environ Entomol** 1979; 8: 1007-13.

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

Rodriguez N, De Lima H, Aguilar CM, Rodriguez A, Barker DC, Convit J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2002; 96 Suppl 1: 105-9.

Rosa AC, Cuba CC, Vexenat A, Barreto AC, Marsden PD. Predominance of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the regions of Três Braços and Corte de Pedra, Bahia, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1988; 82: 409-10.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organisms. **Int J Parasitol** 2004; 34(6): 655-64.

Ryan L, Vexenat A, Marsden PD, Lainson R, Shaw JJ. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1990; 84(6): 786.

San Martin-Savani EM. **Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães errantes do Município de São Paulo, 1995-1996.** São Paulo; 1998. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature** 1977; 265: 687-95.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clin Vet** 1997; 2: 24-8.

Santos SO dos, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann M de P, Freitas RA de, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med Vet Entomol** 1998; 12: 315-17.

Santos SO dos, Arias JR, Hoffmann M de P, Furlan MBG, Ferreira WF, Pereira C, Ferreira L. 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** 2003; 36(5): 633-4.

Secretaria de Estado da Saúde do Mato Grosso do Sul. **Casos de leishmaniose visceral com óbito – 1995 a 2002.** Campo Grande, 2002a.

Secretaria de Estado da Saúde do Mato Grosso do Sul. Coordenação Estadual de Controle de Vetores. **Mapeamento de vetores de leishmaniose visceral.** [“on line”, 04/09/2002b, disponível em <http://www.geocities.com/entomologia2000>].

Service MW. **Mosquito ecology: field sampling methods.** London. Chapman & Hall; 1993. 988p.

Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1989; 83: 783-4.

Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R, Braga RR, Silveira FT. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Pova, Ishikawa & Silveira, in Para State, Brazil. **Ann Parasitol Hum Comp** 1991; 66(6): 243-6.

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

Sherlock IA. Interação ecológica da *Lutzomyia longipalpis* com a *Leishmania chagasi* na epidemiologia da leishmaniose visceral americana. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994; 27 Suppl 4: 579-82.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1996; 97: 671-83.

Silva AR da, Viana GMC, Varonil C, Pires B, Nascimento M do DSD, Costa JML. Leishmaniose visceral (Calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Rev Soc Bras Med Trop** 1997; 30: 359-68.

Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 2001; 65(6): 896-8.

Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2002; 44: 145-9.

Silva OS, Grunewald J. Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* Infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94(5): 579-82.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Pova MM. Leishmaniasis in Brazil: XVII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1982; 76: 830-2.

Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the state of Pará. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1987; 82(2): 289-92.

Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite** 2002; 9(1): 43-50.

Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, Lonardon MV, Dias ML, Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1990; 85: 475-6.

Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med** 2003; 49: 55-60.

Southern, EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol** 1975; 98: 503-17.

Souza SL, Camargo ME. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1966; 8(6): 255-58.

Stevens JR, Nunes VL, Lanham SM, Oshiro ET. Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. **Acta Trop** 1989; 46(4): 213-22.

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. **Ann Parasitol Hum Comp** 1993; 68: 104-6.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1994; 89: 427-34.

Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma doença emergente em terras paulistas. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Suppl 1: 218.

Tolezano JE. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Perpetuação da LTA no Estado de São Paulo, região endêmica de colonização antiga.** São Paulo; 2000. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

Travi BL, Jamarillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Velez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **Am J Trop Med Hyg** 1994; 50: 557-65.

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jamarillo C, Llano R, Velez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. **J Med Entomol** 1996; 33(3): 278-85.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osório Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg** 2001; 64: 119-24.

Uliana SRB, Affonso MHT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Exp Parasitol** 1991; 72: 157-63.

Uliana SRB, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **J Euk Microbiol** 1994; 41(4): 324-30.

Uliana SRB, Ishikawa E, Stempliuk VA, Souza A, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2000; 94: 261-64.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fé Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, *et al.* The identify of *Leishmania* isolated from sandflies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis, Baturité, Northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1994; 50:158-64.

Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124p.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiological characteristics of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the state of Bahia. III. Phlebotomine fauna. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81(3): 293-301.

Walton BC, Brooks WH, Arjona I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. **Am J Trop Med Hyg** 1972; 21: 296-99.

Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. **J Parasitol** 1977; 63(6): 1118-9.

Ximenes MF, Souza MF, Castellon EG. Density of sand flies (Diptera:Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94(4): 427-32.

Yamamoto YI, Nunes VLB, Rego Jr. F de A, Oshiro ET, Dorval MEC. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico de leishmaniose visceral em cães. **Rev Fac Med Vet Zoot Univ São Paulo** 1988; 25: 143-52.

Yoshida ELA, Correa FMA, Marques AS, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi Jr G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *Leishmania braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1990; 85: 133-4.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the west Indies, Central and South America "Diptera: Psychodidae". **Mem Am Entomol Inst** 1994; 54: 1-881.

Zhen L, Swank RT. A simple and high yield method for recovering DNA from agarose gels. **BioTechniques** 1993; 14: 894-6.

Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. **Bull World Health Organ** 1990; 68(4): 465-71.

Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri M, Reyes O, Rodriguez V, Centeno M, Barrios RM, Ulrich M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61(6): 945-50.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil

Telefones: (55-11) 3066- 7734 – fone/fax (55-11) 3064 –7314 – e-mail: mdgracas@usp.br

Of.COEP/196/02

10 de junho de 2002

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **analisou**, o Protocolo de Pesquisa n.º 822, intitulado: “ASPECTOS DA TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSES NO ASSENTAMENTO GUAICURUS E ADJACÊNCIAS, PLANALTO DA BODOQUENA, ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, 2002-03. INFECÇÃO NATURAL EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E VETORES”, apresentado pela pesquisadora Elisa San Martin Mouriz Savani, e por não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de parecer deste Comitê.

Atenciosamente,

Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP

Anexo 2: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (EIE) em amostras de soro e sangue em papel filtro dos cães do Assentamento Guaicurus, fevereiro e março de 2003.

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO	
		RIFI	EIE	RIFI	EIE
124	1 RUCK	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
124	2 RATINHO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
124	3 TROVÃO	160	Reagente	Não Reagente	Reagente
124	4 PITOCO	Não Reagente	<i>Inconclusivo</i>	Não Reagente	Não Reagente
122	5 XAROPINHO	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
122	6 BS	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
122	7 NEGUINHO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
121	8 LELE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
121	9 CHICOTE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
121	10 BURITI	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	<i>Inconclusivo</i>
121	11 FAISCA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
125	12 PITOCO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
125	13 LONTRA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
125	14 XERETA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
126	15 JUPI	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
126	16 CAMOIO	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
118	17 NEGUINHO	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
128	18 FRED	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
117	19 DUQUE	160	Não Reagente	Reagente	Não Reagente
115	20 TEQUE	320	Reagente	Reagente	Reagente
115	21 PANDORGA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
114	22 LUPI	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	23 FURCÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	24 MADRUGA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
16	25 MALHADO	40	Reagente	Não Reagente	Reagente
16	26 NEGÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
24	27 JAVANTE	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	<i>Inconclusivo</i>
24	28 JAVICA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
18	29 LAICA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO	
		RIFI	EIE	RIFI	EIE
18	30 LULA	Não Reagente	<i>Inconclusivo</i>	Não Reagente	Não Reagente
19	31 NIQUE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
19	32 LEÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
22	33 CHALANA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
22	34 PANTERA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
27	35 BARÃO	80	Reagente	Reagente	Não Reagente
27	36 TARZAN	320	Reagente	Reagente	Reagente
13	37 DELEGADO	160	Reagente	Reagente	Reagente
13	38 NIQUE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	39 LOLICA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
119	40 BILA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
119	41 BILICO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
12	42 CAMPEÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
28	43 TANDI	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
28	44 BETOVEM	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	45 LULU	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	46 MALU	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	47 PILOTO 2	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	48 PILOTO 1	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	49 LAQUICHA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
118	50 CAMPEIRA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
9	51 TITIO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
30	52 RALF	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	53 DUQUESA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	54 REGUINHO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	55 JACK	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	56 BETOVEM	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	57 JACK	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	58 PEIXOTO 1	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	59 PEIXOTO 2	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
55	60 BENTINHO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	61 LASSIE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO	
		RIFI	EIE	RIFI	EIE
3	62 PETRUCIO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	63 MONIQUE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	64 RABUDO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
128	65 CHEICK	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	66 DUQUE	40	Reagente	Não Reagente	Reagente
1	67 LEÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
1	68 ESTRANGEIRO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
1	69 AMERICANA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	70 XEIQUE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	71 NEGÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
34	72 CHULE	80	Reagente	Não Reagente	Reagente
6	73 TED	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
53	74 MALAHADO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
53	75 PINGO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
35	76 CHIPE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
35	77 FAROFA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
35	78COMPANHEIRO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
15	79 MIKE	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
48	80 LEÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
48	81 SEM NOME	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
47	82 FERROZ	40	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
54	83 BAJUCO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
54	84 CHUI	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
62	85 REY	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
56	86 ZOOMP	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
56	87 CINDERELA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
56	88 VITÓRIA	640	Reagente	Reagente	Reagente
57	89 PIRULINHO	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
57	90 GURI	40	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
59	91 MENINA	40	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
59	92 NEM	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
59	93 MALHADO	20	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO	
		RIFI	EIE	RIFI	EIE
60	94 PEQUENA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
60	95 BILLI	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
61	96 PRISCILA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
68	97 PILOTO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
110	98 ZAGO	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
110	99 SEM NOME	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
106	100 REX	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
106	101 CARONA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
106	102 CAMPINA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
106	103 LAIKA	80	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
106	104 SERTÃO	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
70	105 PILOTO	80	Reagente	Reagente	Reagente
70	106 PINGUIM	160	Reagente	Reagente	Reagente
108	107 PT	320	Reagente	Reagente	Reagente
108	108 LEÃO	<i>20</i>	Reagente	Não Reagente	Reagente
108	109 STALONE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
99	110 PISQUILA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
95	111 REC	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
103	112 TUPÃ	40	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
103	113 VASCO	<i>20</i>	<i>Inconclusivo</i>	Não Reagente	Não Reagente
103	114 CACETE	160	Reagente	Reagente	Reagente
102	115 FADINHA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
102	116 GINGA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
102	117 TIRIRICA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
40	118 MILLI	<i>20</i>	Reagente	Não Reagente	Reagente
69	119 BALEIA	<i>20</i>	Reagente	Não Reagente	Reagente
69	120 XEBINHA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
69	121 LEÃO	80	Reagente	Reagente	Reagente
69	122 XULICA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
69	123 FRONTEIRA	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente
73	124 CORCEL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
107	125 DUKE	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO	
		RIFI	EIE	RIFI	EIE
107	126 BABY	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
65	127 NEGUINHA	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
65	128 BOB	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
65	129 LASSY	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

Anexo 3: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (EIE) na segunda amostra de soro e sangue em papel filtro, e manifestações clínicas dos cães do Assentamento Guaicurus, junho de 2003.

LOTE	Nº E NOME DO CÃO	SORO		PAPEL FILTRO		SINTOMAS
		RIFI	EIE	RIFI	EIE	
124	3 TROVÃO	40	R	NR	R	Lesão de pele e onicogrifose
124	4 PITOCO	NR	R	NR	R	Assintomático
122	5 XAROPINHO	NR	NR	NR	R	Secreção ocular e onicogrifose
121	10 BURITI	NR	R	NR	I	Onicogrifose
126	16 CAMOIO	NR	R	NR	R	Alopecia, onicogrifose, secreção ocular, emagrecimento
118	17 NEGUINHO	Cão levado pelo Serviço de Zoonoses do Município de Bonito.				
117	19 DUQUE	NR	NR	NR	NR	Assintomático
115	20 TEQUE	80	R	R	R	Alopecia , onicogrifose, lesões no dorso e na cauda, despigmentação no testículo
25	24 MADRUGA	Cão morreu.				
16	25 MALHADO	NR	R	NR	R	Assintomático
24	27 JAVANTE	NR	R	NR	R	Alopecia, emagrecimento
18	30 LULA	NR	NR	NR	NR	Assintomático
27	35 BARÃO	Cão não estava na residência no momento da visita para coleta de sangue.				
27	36 TARZAN	160	R	R	R	Onicogrifose, secreção ocular, alopecia, despigmentação no focinho
13	37 DELEGADO	320	R	R	R	Onicogrifose e emagrecimento
25	39 LOLICA	Cão desapareceu.				
8	53 DUQUESA	NR	R	NR	NR	Onicogrifose
128	65 CHEICK	A dona recusou a nova coleta de sangue.				
2	66 DUQUE	20	R	NR	R	Onicogrifose
34	72 CHULE	Cão morreu				
15	79 MIKE	Não foi possível o acesso até a residência do animal.				
47	82 FERROZ	40	R	NR	R	Assintomático
56	88 VITÓRIA	640	R	R	R	Onicogrifose, secreção ocular, emagrecimento e lesões de pele
57	89 PIRULINHO	NR	R	NR	R	Assintomático
57	90 GURI	20	R	NR	R	Assintomático
59	91 MENINA	20	R	NR	R	Emagrecimento
59	93 MALHADO	NR	R	NR	R	Assintomático
110	98 ZAGO	NR	NR	NR	NR	Assintomático
110	99 SEM NOME	Cão fugiu no momento da coleta e não foi possível encontrá-lo.				
106	101 CARONA	Cão morreu.				
106	103 LAIKA	NR	NR	NR	NR	Onicogrifose e emagrecimento
70	105 PILOTO	Os donos deste lote foram embora do Assentamento Guaicurus e levaram os animais.				
70	106 PINGUIM					
108	107 ET	160	R	R	R	Onicogrifose, secreção ocular, emagrecimento acentuado
108	108 LEÃO	20	R	NR	R	Onicogrifose
103	112 TUPÃ	20	I	NR	R	Assintomático
103	113 VASCO	Cães fugiram no momento da coleta e não conseguimos encontrá-los. Não foi possível retornarmos em outro momento.				
103	114 CACETE					
102	116 GINGA	Os moradores não estavam na residência, na visita para coleta de sangue. Não foi possível retornarmos em outro momento.				
102	117 TIRIRICA					
40	118 MILLI	Não foi possível ir até este lote fazer a coleta de sangue.				
69	119 BALEIA	Cão morreu.				
69	120 XEBINHA	40	R	NR	R	Onicogrifose
69	121 LEÃO	40	R	R	R	Onicogrifose, lesões de pele, emagrecimento acentuado
69	123FRONTEIRA	NR	R	NR	R	Assintomático

NR = Não Reagente; R = Reagente; I = Inconclusivo

Anexo 4 – Resultados das PCR em aspirado de medula óssea e creme leucocitário e seqüenciamento, em cães do Assentamento Guaicurus, junho de 2003.

Lote	Nº e nome do cão	Aspirado de medula óssea		Creme Leucocitário		Sequenciamento com S18**
		S4 / S12	S17/ S18 *	S4 /S12	S17 / S18 *	
124	3 TROVÃO	Negativo	Positivo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>L. (L.) amazonensis</i>
124	4 PITOCO	Não foi colhido	-	Negativo	Positivo	<i>L. (L.) chagasi</i>
122	5 XAROPINHO	Negativo	Negativo	Positivo com bandas inespecíficas (1:10)	Positivo	<i>L. (L.) chagasi</i>
121	10 BURITI	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>L. (L.) chagasi</i>
126	16 CAMOIO	Negativo	Negativo	Banda muito fraca	Positivo	<i>L. (Viannia)</i>
117	19 DUQUE	Não foi colhido	-	Banda fraca	Positivo com uma banda inespecífica	<i>L. (Viannia)</i>
115	20 TEQUE	Negativo	Positivo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>L. (L.) amazonensis</i>
16	25 MALHADO	Negativo	Positivo	Banda muito fraca	Positivo	<i>L. (Viannia)</i>
24	27 JAVANTE	Negativo	Negativo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>L. (Viannia)</i>
18	30 LULA	Não foi colhido	-	Negativo	Negativo	-
27	36 TARZAN	Positivo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
13	37 DELEGADO	Negativo	Positivo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
8	53 DUQUESA	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>

Lote	Nº e nome do cão	Aspirado de medula óssea		Creme Leucocitário		Sequenciamento com S18**
		S4 / S12	S17/ S18 *	S4 /S12	S17 / S18 *	
2	66 DUQUE	Negativo	Positivo (fraco)	Banda muito fraca	Positivo	<i>L. (Viannia)</i>
47	82 FERROZ	Negativo	Negativo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
56	88 VITÓRIA	Banda muito fraca	Positivo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
57	89 PIRULINHO	Banda fraca	Positivo	Banda muito fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
57	90 GURI	Negativo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
59	91 MENINA	Negativo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
59	93 MALHADO	Não foi colhido	-	Positivo	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
110	98 ZAGO	Negativo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
106	103 LAIKA	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
108	107 ET	Banda fraca	Positivo	Positivo com bandas inespecíficas	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
108	108 LEÃO	Negativo	Positivo	Banda muito fraca	Positivo	<i>Leishmania (Viannia)</i>
103	112 TUPÃ	Negativo	Positivo	Banda muito fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
69	120 XEBINHA ***	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
69	121 LEÃO	Positivo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>
69	123 FRONTEIRA	Negativo	Positivo	Banda fraca	Positivo	<i>Leishmania (L.) chagasi</i>

* Empregou-se o produto da PCR com os oligonucleotídeos S4 e S12

** Utilizou-se o produto da PCR com os oligonucleotídeos S17 e S18

*** O seqüenciamento do produto da PCR com S4/S12 deu *Trypanosoma evansi*.

Anexo 5 - Distribuição mensal das chuvas no Município de Bonito - MS, de abril de 2002 a outubro de 2003, e da média mensal do período de 1981 a 2003.

Anexo 6 - Média de Williams para fêmeas de *Lu. longipalpis* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - peridomicílio	7,0	1,0	3,9	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - casa	1,0	0,0	0,0	0,7	0,4	2,5	0,0	0,0	1,7	0,0	0,4	0,0
L 19 - mata	2,0	14,0	0,7	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	4,7	0,7	0,7	0,7
L 19 - peridomicílio	0,0	171,2	4,8	807,2	69,2	99,2	2,5	223,9	10,2	6,8	0,0	3,6
L 20 - casa	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	1,0	0,0	2,5	4,2	0,4	0,0	0,0
L 20 - cultivo	0,0	0,0	0,4	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	0,4	0,0
L 20 - mata	1,0	1,0	0,4	20,2	1,0	0,0	0,4	5,0	10,8	0,7	1,0	0,4
L 20 - peridomicílio	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,8	1,0	0,0	0,0
L 35 - casa	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 56 - gruta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - casa	2,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
L 59 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - casa	1,0	0,0	0,0	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	7,0	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
L 110 - cultivo	0,0	2,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	1,0	5,0	1,5	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
L 124 - casa	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	1,0	16,0	10,6	19,1	11,9	2,0	0,4	2,2	2,3	0,4	2,5	0,0
L 124 - peridomicílio	0,0	2,0	0,0	4,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,4	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Anexo 7 - Média de Williams para machos de *Lu. longipalpis* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	2,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
L 02 - peridomicílio	11,0	14,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
L 19 - casa	1,0	0,0	0,4	1,8	0,4	0,4	0,0	0,4	2,5	1,0	0,4	0,0
L 19 - mata	4,0	40,0	2,5	0,0	1,0	2,0	0,0	0,0	28,3	2,2	1,0	1,2
L 19 - peridomicílio	0,0	286,7	15,9	566,5	297,5	228,1	1,2	571,8	16,5	27,1	0,0	0,0
L 20 - casa	0,0	1,0	0,0	0,0	0,7	0,4	0,0	1,7	7,6	2,5	0,4	0,7
L 20 - cultivo	1,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	8,5	1,0	1,5	0,0
L 20 - mata	4,0	4,0	0,4	23,5	2,3	11,3	0,4	6,3	20,8	1,2	0,0	1,0
L 20 - peridomicílio	14,0	1,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	8,5	1,8	0,0	0,0
L 35 - casa	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
L 56 - gruta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - casa	6,0	0,0	0,0	1,0	1,2	0,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
L 59 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
L 102 - casa	2,0	0,0	0,4	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	21,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,4
L 110 - cultivo	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	0,0	36,0	2,7	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 124 - casa	1,0	1,0	0,4	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	9,0	11,0	26,3	22,0	33,4	3,0	0,7	8,0	6,4	1,8	4,7	0,4
L 124 - peridomicílio	0,0	5,0	0,4	8,9	0,0	0,0	0,4	0,0	1,2	0,0	1,0	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Anexo 8 - Média de Williams para fêmeas de *Lu. almerioi* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - mata	3,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,4	0,4	0,0
L 19 - peridomicílio	0,0	63,0	0,0	63,4	3,9	5,3	0,4	20,0	4,9	6,3	0,0	14,5
L 20 - casa	0,0	1,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
L 20 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 20 - mata	2,0	23,0	8,0	49,5	0,4	0,7	0,0	1,8	4,8	3,1	1,5	0,0
L 20 - peridomicílio	3,0	5,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,4	1,0	0,7	1,0	0,0
L 35 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 56 - gruta	5,0	14,0	6,5	41,2	4,7	2,3	0,0	2,3	1,5	0,0	0,4	8,2
L 59 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	0,4	0,0
L 59 - peridomicílio	0,0	1,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	0,0	1,0	0,4	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 124 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Anexo 9 - Média de Williams para machos de *Lu. almerioi* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - mata	0,0	2,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,4	0,4
L 19 - peridomicílio	0,0	3,0	0,0	2,2	0,4	0,4	0,0	5,3	1,0	2,9	0,0	0,0
L 20 - casa	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0
L 20 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
L 20 - mata	6,0	12,0	1,5	11,0	0,7	0,4	0,0	0,7	2,7	4,0	0,0	0,4
L 20 - peridomicílio	0,0	5,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 35 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
L 56 - gruta	1,0	8,0	4,1	13,5	4,1	1,5	1,7	1,8	0,4	1,8	0,7	1,8
L 59 - casa	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,4
L 59 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - cultivo	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	0,0	3,0	1,0	1,5	1,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Anexo 10 - Média de Williams para fêmeas de *Ny. whitmani* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003.

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 19 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 19 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0
L 19 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	7,4	6,4	6,4	0,0	14,2	0,0	1,0	0,0	0,0
L 20 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 20 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0
L 20 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0
L 20 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,7	0,0	0,0
L 35 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 56 - gruta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	0,0	0,0	0,0	0,4	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote

Anexo 11 - Média de Williams para machos de *Ny. whitmani* por local de captura no Assentamento Guaicurus, novembro de 2002 a outubro de 2003

Local	Meses											
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
L 02 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 02 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
L 19 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
L 19 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,4	0,0	0,0
L 19 - peridomicílio	0,0	0,0	0,7	17,3	6,1	14,5	0,0	55,5	5,2	0,7	0,0	0,0
L 20 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 20 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
L 20 - mata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,4	0,4	0,0	0,0
L 20 - peridomicílio	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0
L 35 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 35 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 56 - gruta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 59 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 102 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - cultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 110 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - mata	0,0	0,0	0,4	0,4	1,2	0,0	0,0	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0
L 124 - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
Sede - casa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sede - peridomicílio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

L = Lote