

**MARIA ELIZABETH MORAES CAVALHEIROS DORVAL**

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM ÁREA DE LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR NO MUNICÍPIO DE BELA VISTA, ESTADO DE MATO  
GROSSO DO SUL, BRASIL**

**CAMPO GRANDE – MS**

**2006**

**MARIA ELIZABETH MORAES CAVALHEIROS DORVAL**

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM ÁREA DE LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR NO MUNICÍPIO DE BELA VISTA, ESTADO DE MATO  
GROSSO DO SUL, BRASIL**

Tese submetida ao Programa Multiinstitucional de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede  
Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília,  
Universidade Federal de Goiás e Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos  
requisitos necessários para a obtenção do grau  
de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha**

**CAMPO GRANDE – MS**

**2006**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob a orientação do Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, e contou com o apoio financeiro da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS), e da UFMS. O apoio logístico foi concedido pela Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul.

***Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos  
seres humanos.***

***A consciência de aprender tudo o que foi ensinado  
pelo tempo afora.***

***Lembraria os erros que foram cometidos para que  
não mais se repetissem.***

***A capacidade de escolher novos rumos.***

***Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que  
é indispensável:***

***além do pão, o trabalho;***

***além do trabalho, a ação;***

***e, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de  
buscar no interior de si mesmo, a resposta e a força  
para encontrar a saída.***

***Mahatma Gandhi***

***Aos meus pais, Ignêz e Heraclides  
espelhos para a construção de minha vida***

***A minha filha Fernanda,  
pelo incondicional amor***

## **Agradecimentos**

A Deus pelo imensurável dom da vida e pelas valiosas oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha pela orientação, confiança, amizade e estímulo desde o início dos trabalhos.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, exemplo de profissionalismo e dedicação, minha admiração e o meu muito obrigada pela sua amizade, incansável orientação e pelas oportunidades de compartilhar seus ensinamentos desde o início de minha vida acadêmica.

Aos meus familiares, pelo amor, pela compreensão e paciência durante minhas ausências no decorrer dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, pela amizade, colaboração e presteza com que sempre atendeu nosso apelo para dirimir as dúvidas durante os trabalhos de campo e na redação do trabalho.

A Elisa Teruya Oshiro, querida amiga de todas as horas, que além de assumir minhas atividades junto à disciplina nas minhas ausências, sempre me ofereceu as melhores palavras e o apoio necessário nas mais difíceis tarefas e nos momentos de desânimo.

A Geucira Cristaldo, que com sua experiência, dedicação, amizade e boa vontade, esteve sempre ao meu lado e foi incansável em todas as etapas deste trabalho.

A Hilda Carlos da Rocha, que mesmo aposentada se fez imensamente solidária e amiga permanecendo ao meu lado, incentivando-me e auxiliando-me durante a execução dos trabalhos de campo.

A Zélia Soares da Silva, exemplo de perseverança, pelo carinho, pelos mimos de todas as horas e pelas sempre generosas palavras de estímulo para que tudo desse certo.

A Alessandra Gutierrez de Oliveira, querida ex-aluna, amiga e colega de disciplina, seus bons sentimentos a tornam uma pessoa especial! Obrigada por sua solicitude, suas palavras e gestos de otimismo e confiança, além, é claro, das contribuições durante todas as etapas do trabalho.

A Tulia Peixoto Alves que com sua amizade, dedicação, alegria e carinho se fez presente em minha vida e foi uma incansável colaboradora nas diferentes fases do trabalho.

Ao Murilo Andrade Alves, pela amizade, alegria, e inestimável colaboração nos trabalhos de campo.

Às amigas Cássia Rejane de Brito Leal e Alda Maria Teixeira Ferreira, que sempre somaram esforços para a realização deste trabalho.

A Ubirazilda Maria Resende pelo auxílio na descrição da área.

Aos comandantes do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec), no período de 2002 a 2006, pelo apoio logístico dispensado à pesquisa, pela cordialidade e receptividade da equipe.

Aos amigos do 10º RCMec, André Maria Zimmermann e sua esposa Juliana, Claudemar, Nelson, Alexandre, Fernando, Solano, Sgto. Mendes, Sgto. Délio, aos motoristas do Regimento, ao pessoal do Rancho, obrigada não só pela eficiente colaboração nas capturas, guarda do material de pesquisa, compreensão e paciência quando nos apoderávamos do laboratório mas, principalmente pela amizade, pela sempre calorosa recepção, pelas visitas ao Paraguai, pelos inesquecíveis almoços no Regimento, os famosos churrascos do sábado e os sempre alegres jantares oferecidos por Solano e Bernadete... já estamos com saudades.

À Dra. Suzzane Jacob Serruya, Coordenadora de Desenvolvimento Institucional da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/Departamento de Ciência e Tecnologia, pela confiança e incentivo durante o processo de obtenção dos recursos.

A FUNDECT/ Decit/SCTIE/MS pelo apoio financeiro inicial.

A Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde, na pessoa do senhor Elias Monteiro, por compreender nossos objetivos e oferecer o apoio logístico durante os dois anos de estudo.

Aos motoristas da Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde que nos acompanharam, em especial ao senhor João Anastácio, que com sua alegria e irreverência proporcionou à equipe prazerosas viagens, bons e alegres momentos durante os exaustivos trabalhos de campo.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos Gerais.....	1
1.2. A Leishmaniose Tegumentar.....	4
1.3. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.....	9
1.4. Os Flebotomíneos.....	11
1.5. Situação Epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar.....	13
1.6. As Leishmanioses em Mato Grosso do Sul.....	15
1.7. Justificativa.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Área de Estudo.....	23
3.1.1. Características Locais.....	23
3.1.2. Pacientes.....	24
3.1.3. Pontos de Capturas.....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Artigo 1. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> Publicado na Revista da Sociedade de Medicina Tropical 2006; 39: 43-46.....	34
4.2. Artigo 2. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de área de leishmaniose tegumentar associada a <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.....	35

4.3. Artigo 3. Captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com armadilha de Disney em área de ocorrência de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.....	56
4.4. Artigo 4. Modificação da armadilha de Disney para captura de flebotomíneos	74
4.5. Artigo 5. Infecção natural em hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) sentinela em área de leishmaniose tegumentar associada à infecção por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>121</b>

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1. Localização do município de Bela Vista, MS.
- Figura 2. Mapa da área do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS e respectivos pontos de captura de flebotomíneos.
- Figura 3. Vista do ponto de captura Pista de Corda, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 4. Vista da Pista de Primeiros Socorros no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 5 A e B. Aspecto geral do ponto de captura Base do Primeiro Esquadrão, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 6 A e B. Aspectos da mata no ponto de captura Pista de Sobrevivência, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 7 A e B. Vista geral das áreas de Acampamento, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 8 A e B. Vista geral da pocilga e do galinheiro na área da Granja do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.
- Figura 9. Aspecto geral das baias no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
NNN	Novy-Mac-Neal-Nicole
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
IFN- $\gamma$	Interferon gama
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- $\beta$	Fator beta de transformação de crescimento
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
MLEE	<i>Multi Locus Enzyme Electrophoresis</i>
Taq DNA	DNA de <i>Termus aquaticus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
kDNA	DNA de cinetoplasto
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
dATP	Deoxinucleotídeo adenosina trifosfatado
dTTP	Deoxinucleotídeo timina trifosfatado
dCTP	Deoxinucleotídeo citosina trifosfatado
dGTP	Deoxinucleotídeo guanina trifosfatado
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
10º RCMec	10º Regimento de Cavalaria Mecanizado
FUNDECT	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
Decit/SCTIE/MS	Departamento de Ciência e Tecnologia, da Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde
IOC-Fiocruz	Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Instituto Oswaldo Cruz

REDE CENTRO-OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNB/UFG/UFMS

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM ÁREA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
NO MUNICÍPIO DE BELA VISTA, ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

MARIA ELIZABETH MORAES CAVALHEIROS DORVAL

Os estudos epidemiológicos realizados permitiram o isolamento e a identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em pacientes procedentes do município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, ampliando-se, portanto, o conhecimento da distribuição geográfica desta espécie de parasito. As capturas de flebotomíneos foram realizadas no período de fevereiro de 2004 a janeiro de 2006, na mata, utilizando-se armadilhas automáticas luminosas (AAL), de Shannon e de Disney, e em abrigo de animais domésticos, com AAL. Com o emprego dos três tipos de armadilhas capturou-se 1.999 espécimes pertencentes a três subtribos, oito gêneros e 19 espécies de Phlebotominae. Brumptomyiina: *Brumptomyia avellari*, *Br. brumpti* e *Brumptomyia* sp; Lutzomyiina: *Evandromyia aldafalcaoae*, *Ev. bourrouli*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. evandroi*, *Ev. lenti*, *Ev. teratodes*, *Ev. termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Pintomyia christenseni* e *Sciopemyia sordellii*; Psychodopygina: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Ps. campograndensis*, *Ps. punctigeniculata* e *Ps. shannoni*. Do total de espécimes capturados, 22,7% foram nas armadilhas de Shannon (33,9% das fêmeas de *Ps. punctigeniculata*; 7,7% de *Bi. flaviscutellata* e 4,4% de *Lu. longipalpis*), 17,7% nas AALs (na mata, 70,6% dos espécimes de *Brumptomyia* e em abrigos de animais domésticos, 80,2% de *Lu. longipalpis*) e 59,6% nas armadilhas de Disney (57,6% de *Ev. bourrouli* e 41,4% de *Bi. flaviscutellata*, sendo 81,7% das fêmeas, desta espécie). Pela primeira vez, se registra a presença de *Ev. evandroi* no Estado. *Bi. flaviscutellata* esteve distribuída em todos os ambientes de mata amostrados, com frequência mais regular nos meses secos, porém, mostrou pico em março. Não foi observada a infecção natural por *Le. (Le.) amazonensis* em *Bi. flaviscutellata*, porém, seu pico de captura coincidente com o período da infecção natural em hamsters (*Mesocricetus auratus*) sentinelas, permitem supor a existência de um ciclo enzoótico na área, com a infecção acidental e periódica do homem que adentra a área, uma vez que fêmeas deste flebotomíneo compareceram, embora com frequência baixa, em armadilhas de Shannon, sugerindo a sua antropofilia. Além da presença de vetores de *Le. (Le.) amazonensis* e *Le. (Le.) chagasi*, constatou-se ainda a presença de *Ny. whitmani*, reconhecido vetor de *Le. braziliensis*, no entanto, em baixa frequência.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, Flebotomíneos, Isca animal, Infecção natural, Mato Grosso do Sul, Vetores.

REDE CENTRO-OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNB/UFG/UFMS

**EPIDEMIOLOGICAL STUDIES IN AREA OF TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN  
THE MUNICIPALITY OF BELA VISTA, STATE OF MATO GROSSO DO SUL,  
BRAZIL**

**ABSTRACT**

**THESIS**

**MARIA ELIZABETH MORAES CAVALHEIROS DORVAL**

*The epidemiological studies undertaken permitted the isolation and identification of Leishmania (Leishmania) amazonensis in patients from the municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul State, Brazil, thus expanding our knowledge of this parasite's distribution. The captures of phlebotomines were undertaken from February 2004 to January 2006, using automatic light traps (ALTs), Shannon traps and Disney traps in forested environments and ALTs in domestic animal shelters. With the three types of traps, a total of 1,999 specimens belonging to three subtribes, eight genera and 19 species of Phlebotominae were captured: Brumptomyiina: Brumptomyia avellari, Br. brumpti and Brumptomyia sp; Lutzomyiina: Evandromyia aldafalcaoae, Ev. bourrouli, Ev. cortelezii, Ev. evandroi, Ev. lenti, Ev. teratodes, Ev. termitophila, Lutzomyia longipalpis, Pintomyia christenseni and Sciopemyia sordellii; Psychodopygina: Bichromomyia flaviscutellata, Nyssomyia whitmani, Psathyromyia aragai, Ps. campograndensis, Ps. punctigeniculata and Ps. shannoni. Of this total, 22.7% were captured on the Shannon traps (33.9% of the females being of Ps. punctigeniculata; 7.7% of Bi. flaviscutellata and 4.4% of Lu. longipalpis); 17.7% in the ALTs (in the forest 70.6% of the specimens captured belonged to Brumptomyia and in the domestic animal shelters, 80.2% belonged to Lu. longipalpis) and 59.6% in the Disney traps (57.6% of Ev. bourrouli and 41.4% of Bi. flaviscutellata; 81.7% of the females being of this species). The occurrence of Ev. evandroi in the State is here registered for the first time. Bi. flaviscutellata occurred in all the forested environments sampled, with more regular frequencies during the dry period of the year, though showing a peak in March. No natural infection by Le. amazonensis was observed in Bi. flaviscutellata, however its peak of capture coincident with the period of natural infection in hamsters (Mesocricetus auratus) used as bait in Disney traps, suggests the existence of an enzootic cycle in the area, with periodic and accidental infection of people who enter it, since females of this sandfly were captured (although in low frequency) on the Shannon traps, indicating their anthropophily. Besides the presence of the vectors of Le. amazonensis and Le. chagasi, Ny. whitmani, a known vector of Le. braziliensis, was found, albeit in very low frequency.*

**Key-words:** Leishmania amazonensis, Phlebotomines, animal bait, natural infection, Mato Grosso do Sul state, Vectors.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são zoonoses decorrentes do parasitismo por diversas espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, que acometem o homem com manifestações clínicas nas formas visceral, cutânea e mucocutânea <sup>1</sup>.

O gênero *Leishmania* possui muitas espécies, e várias classificações taxonômicas foram propostas, baseadas em características epidemiológicas e biológicas que incluem manifestações clínicas, distribuição geográfica, crescimento *in vitro*, comportamento em animais de laboratório e nos insetos vetores. A classificação é suplementada com uma variedade de métodos bioquímicos e imunológicos. As técnicas moleculares definem características próprias intrínsecas do parasito e que não podem ser modificadas ou mascaradas por fatores do hospedeiro ou do meio ambiente <sup>2,3,4</sup>.

Com base nos estudos sobre o comportamento desses protozoários em animais de experimentação, em meios de cultura e no tubo digestivo de flebotomíneos, Lainson e Shaw <sup>2</sup> (1972) introduziram a idéia de dois complexos ou grupos de *Leishmania* do Novo Mundo: *braziliensis* e *mexicana*.

Atualmente o gênero *Leishmania* compreende dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* <sup>5,6</sup>. As formas promastigotas das espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino médio e anterior do inseto (seção Supr pylaria), enquanto aquelas do subgênero *Viannia* além de ocuparem estas regiões também são encontradas no intestino posterior (seção Pery pylaria).

As leishmanioses acometem o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais, com diferentes vetores e reservatórios, constituindo uma das doenças de importância mundial <sup>7</sup>.

São parasitoses amplamente difundidas por todos os continentes e segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, com 12 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 1,5

---

milhão de casos registrados a cada ano para a leishmaniose tegumentar e cerca de 500.000 para a forma visceral<sup>8</sup>.

A leishmaniose tegumentar (LT) é mais prevalente e se caracteriza por lesões cutâneas, com a lesão primária geralmente ocorrendo no local da picada do inseto vetor, sendo, portanto, mais freqüente em áreas expostas do corpo. As apresentações clínicas são diversas e incluem as formas: cutânea localizada, disseminada, difusa e mucosa, sendo que nesta última pode ocorrer destruição do septo nasal e boca, resultando em deformidades severas<sup>9,10</sup>.

Já a leishmaniose visceral (LV), também denominada Calazar, pelo aspecto escurecido que confere à pele no Velho Mundo, é uma síndrome clínica que acomete meio milhão de pessoas a cada ano<sup>8,10</sup>. Decorrente das ações produzidas pelo seu agente etiológico no sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, a doença se manifesta por febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, progressivo emagrecimento, que, quando não tratada precocemente, pode evoluir para o óbito<sup>11,12</sup>.

O modo de transmissão usual das leishmanioses é através da picada de fêmeas de flebotomíneos, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo conhecidas, nas Américas, aproximadamente 470 espécies, das quais, cerca de 60 estão envolvidas na transmissão das leishmanioses<sup>13,14,15</sup>.

Na dependência da localização geográfica e da espécie de parasito, participam do processo de transmissão diferentes gêneros e espécies com peculiaridades em seu ciclo biológico que garantem a preservação e reprodução do parasito em questão.

O gênero *Leishmania* possui duas formas evolutivas em seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros: a forma amastigota nos vertebrados, e a promastigota, nos invertebrados.

As formas amastigotas são arredondadas, com um núcleo e cinetoplasto, sem flagelo exterior, medindo de 2 a 5 $\mu$  de diâmetro, multiplicando-se por divisão binária no interior dos fagossomos de células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos e monócitos).

A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo do vetor ou em meios de cultura apropriados. Apresenta-se como uma forma alongada, de 10 a 15 $\mu$ , com um longo flagelo, e é considerada a forma infectante, possuindo moléculas de superfície que se ligam aos receptores das células do hospedeiro <sup>16</sup>.

Quando um flebotomíneo fêmea não infectado realiza seu repasto sanguíneo sobre um hospedeiro vertebrado, ingere células parasitadas que ao se romperem no interior de seu intestino liberam as formas amastigotas. Estas se transformam em promastigotas que, após intensa multiplicação diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, migrando até a probóscida do inseto. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o inseto inocula estas formas juntamente com a saliva.

No hospedeiro vertebrado estas promastigotas são fagocitadas pelas células do sistema monocítico fagocitário, e no interior dos fagolisossomos se diferenciam em amastigotas, resistem às enzimas fagolisossomais e se multiplicam até a destruição da célula <sup>17, 18</sup>.

Nas Américas, o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie associada à ocorrência da LV, porém, com o desenvolvimento das técnicas moleculares e a constatação de que essa espécie de parasito é bioquímica e antigenicamente indistinguível de *Leishmania (Leishmania) infantum*, a tendência é considerá-las como sendo o mesmo microrganismo <sup>19, 20</sup>.

Nas formas dermatrópicas estão envolvidas pelo menos 10 espécies de *Leishmania*, sendo que, no Brasil, até o momento, são identificadas sete espécies que atuam na etiologia de casos humanos. As principais pertencem a dois subgêneros: *Viannia*, que inclui espécies do complexo *braziliensis*, e *Leishmania*, que é composto por aquelas do complexo *mexicana* <sup>21, 22</sup>.

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa crônica largamente distribuída no continente americano, excetuando-se o Canadá, algumas ilhas do Caribe, Chile e Uruguai <sup>23, 24, 25</sup>.

No Brasil, a parasitose é diagnosticada em praticamente todos os Estados, e estatísticas oficiais mostram crescimento progressivo e registros ocasionais de surtos <sup>26, 27, 28</sup>.

## 1.2. A leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar é uma doença autóctone das Américas que representa importante problema de saúde pública em virtude de sua ampla distribuição geográfica, alta prevalência e severidade dos casos, acrescido dos problemas físicos e psíquicos que ocasiona, acarretando sérios prejuízos socioeconômicos ao país por comprometer o indivíduo em sua fase mais produtiva <sup>8</sup>.

29, 30, 31, 32

Embora uma resposta celular e humoral contra o parasito seja desenvolvida, os mecanismos envolvidos na resposta imunológica dos portadores de LT ainda não estão claramente elucidados. O desenvolvimento de resposta imune é precoce e, similarmente ao que é observado em modelo experimental, as subpopulações de linfócitos T circulantes e as citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10) produzidas por estas células estão associadas aos processos de desenvolvimento da doença, bem como a evolução para a cura e proteção contra a parasitose <sup>18</sup>.

Na dependência da espécie do agente etiológico e da resposta imunológica do hospedeiro, a LT apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de lesões únicas ulceradas ou nodulares a casos de múltiplas lesões disseminadas ou, ainda, difusas, levando a quadros graves facilitando a ocorrência de infecções secundárias. É freqüente o comprometimento de mucosa, com lesões destrutivas e mutilantes, o que gera transtornos emocionais aos pacientes <sup>18, 23, 31</sup>.

No Brasil são identificadas sete espécies que atuam na etiologia de casos humanos de LT: *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987, *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989; *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa & Ishikawa, 1989; *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, De Souza & Lainson, 2002 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 <sup>14</sup>.

### ***Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911**

É a espécie que apresenta maior complexidade epidemiológica. É encontrada em países das Américas Central e Latina, apresentando ampla distribuição no Brasil, do sul do Pará ao Sudeste, atingindo também o Centro Sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental <sup>14, 33</sup>.

Caracteriza-se por apresentar peculiaridades regionais relacionadas provavelmente às espécies de vetores e reservatórios envolvidos, e ao perfil ecoepidemiológico <sup>34, 35</sup>.

A doença no homem caracteriza-se com frequência por úlcera única, porém, macrófagos parasitados podem ser responsáveis pelo transporte dos parasitos para outras partes do corpo com o estabelecimento de lesões secundárias. Assim, a principal complicação é a metástase para a mucosa da região nasobucofaringeana dentro de alguns meses ou anos após a instalação da lesão inicial, sendo responsável por transtornos psicológicos ao paciente em função do caráter desfigurante e mutilante <sup>8, 36</sup>.

Uma vez que as manifestações clínicas estão diretamente relacionadas ao estado imunológico do paciente, a co-infecção LT e HIV, pelo progressivo comprometimento da resposta celular que favorece a replicação e a disseminação de organismos intracelulares como a *Leishmania*, tem sido responsável por importante diversidade clínica traduzida por quadros mais graves e refratários ao tratamento <sup>37, 38, 39</sup>.

Quanto aos reservatórios, a presença do parasito tem sido relatada em roedores e em marsupial, *Didelphis marsupialis* <sup>29, 40, 41</sup>. Embora algumas identificações da espécie de *Leishmania* encontrada tenham sido baseadas somente em características biológicas, atualmente, através da utilização de técnicas moleculares tem sido possível confirmar o parasitismo de roedores por *Le. (Vi.) braziliensis*, reforçando o papel desses animais como reservatórios primários do parasito <sup>42, 43</sup>.

O padrão epidemiológico clássico no país é o de uma zoonose de transmissão silvestre, no qual o homem adquire a parasitose ao adentrar seu foco natural, onde coexistem seus reservatórios naturais e vetores <sup>1, 5</sup>.

Destacam-se nesse contexto, situações particulares que expõem o homem à transmissão, tais como, derrubada de matas para a construção de estradas e assentamentos, extração de madeira, desmatamentos com finalidade agropecuária e industrial, áreas de preservação ambiental, dentre outras, responsáveis pela ocorrência da LT de forma endêmica em quase todos os Estados brasileiros <sup>8, 44, 45</sup>.

Entretanto, em algumas regiões, com maior influência antrópica, particularmente, no Sudeste e no Nordeste, a cobertura vegetal degradada tem submetido as populações de vetores, reservatórios silvestres e parasitos a um processo de adaptação em ecossistemas alterados com a transmissão da parasitose ocorrendo em ambientes domiciliar e peridomiciliar <sup>44, 46, 47, 48</sup>.

Em algumas áreas do país, esta espécie de parasito vem sendo detectada em cães e eqüídeos <sup>1, 49, 50, 51, 52</sup>.

Na transmissão para o homem, várias espécies de flebotomíneos são incriminadas. No Pará e Ceará, as espécies altamente antropofílicas *Psychodopygus wellcomei* e, mais recentemente, *Psychodopygus complexus*, são os principais vetores <sup>53, 54, 55</sup>. Nos Estados do Amazonas e de Rondônia, *Psychodopygus carrerai* e *Psychodopygus davisii* já foram encontrados infectados por *Le. (Vi.) braziliensis* <sup>3, 4</sup>.

Em estados do Nordeste (MA, CE, PE, BA), Sudeste (MG, ES), Centro Oeste (GO, MS, MT) e Sul (norte do PR), *Nyssomyia whitmani*, um importante vetor nessas regiões, é a espécie mais abundante e freqüente em ambiente antrópico <sup>1, 48, 51, 56, 57, 58, 59, 60, 61</sup>.

*Nyssomyia intermedia*, outra espécie antropofílica que atualmente tem se mostrado bem adaptada ao ambiente antrópico, tem sido incriminada como espécie vetora em algumas áreas das regiões Sudeste e Sul do país <sup>44, 46, 62, 63</sup>, assim como *Nyssomyia neivai*, considerada como sinônimo júnior de *Ny. intermedia* e revalidada por Marcondes <sup>64</sup> (1996).

### ***Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954**

*Le. (Vi.) guyanensis* é encontrada na Colômbia, Guiana Francesa e Suriname. No Brasil, tem ocorrência restrita à região amazônica, ao norte do rio Amazonas, abrangendo os estados do Amapá, Roraima, Amazonas, Pará, Goiás e

recentemente Mato Grosso.

Geralmente atinge indivíduos do sexo masculino, tendo em vista suas atividades ocupacionais e também os exercícios militares. Causa lesões cutâneas únicas ou múltiplas em consequência de picadas simultâneas do vetor ou da disseminação linfática do parasito, e raramente é responsável pelo comprometimento mucoso <sup>35, 36, 65</sup>.

*Nyssomyia umbratilis*, o principal flebotomíneo envolvido na transmissão, é uma espécie bastante antropofílica, encontrada em troncos de árvores e atacam o homem em grande quantidade. Apresenta como hospedeiros primários preguiças (*Choloepus didactylus*) e tamanduás (*Tamandua tetradactyla*), e como hospedeiros secundários, marsupiais e roedores <sup>1, 14, 36, 66</sup>.

### ***Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987**

*Le. (Vi.) lainsoni* é responsável por lesões cutâneas simples, sem evidência de invasão de mucosas. Sua presença tem sido assinalada nas florestas ao norte do Pará e recentemente em áreas florestais do Peru e da Bolívia. Tem como reservatório o roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctida) e como vetor *Trichophoromyia ubiquitalis*, uma espécie pouco antropofílica <sup>1, 14, 67, 68, 69, 70</sup>.

### ***Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa & Ishikawa, 1989**

*Le. (Vi.) shawi* está associada a casos humanos assinalados em localidades da região Amazônica, ao sul do rio Amazonas e no Pará. O parasito comumente determina lesões cutâneas únicas, geralmente ulceradas, embora casos de múltiplas lesões já tenham sido observados. Tem como reservatórios, macacos (*Cebus apella* e *Chiropotes satanas*), preguiças (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e o quati (*Nasua nasua*). Seu vetor, ainda sem denominação, é uma espécie de flebotomíneo do complexo *Ny. whitmani* que tem como hábitat natural, troncos de árvores em florestas primárias, atacando avidamente o homem quando perturbadas

<sup>1, 14, 36, 51, 71</sup>.

***Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989**

*Le. (Vi.) naiffi* ocorre nos Estados do Pará e Amazonas e também na Guiana Francesa. É responsável por casos humanos de pequenas lesões cutâneas simples ou ulceradas, que geralmente apresentam cura espontânea. Foi isolada inicialmente de tatu, *Dasyurus novemcintus*, até hoje seu único hospedeiro silvestre conhecido. Seu vetor principal não é bem conhecido, entretanto, o flebotomíneo *Psychodopygus ayrozai*, com baixa atratividade pelo homem, tem sido freqüentemente encontrado infectado por este parasito, e outras duas espécies, altamente antropofílicas, *Py. paraensis* e *Py. squamiventris*, são ocasionalmente observadas infectadas e provavelmente estão envolvidas na transmissão para o homem<sup>1, 14, 51, 72</sup>.

***Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, De Souza & Lainson, 2002**

*Le. (Vi.) lindenbergi* foi recentemente descrita a partir de casos humanos em soldados que realizaram manobras noturnas em áreas de florestas degradadas no município de Belém, Estado do Pará. Estudos sobre flebotomíneos realizados no local da infecção evidenciaram a predominância e a possível participação de *Nyssomyia antunesi* na transmissão ao homem. Este inseto, que pica avidamente o homem tem sido encontrado infectado por formas promastigotas na Ilha de Marajó, porém, sem a identificação específica do parasito. Em infecções experimentais utilizando-se *Lu. longipalpis*, observou-se desenvolvimento dos flagelados aderidos à parede do intestino posterior, característica esta de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*<sup>73, 74</sup>.

***Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972**

A leishmaniose tegumentar cuja etiologia é atribuída a *Le. amazonensis* tem sido assinalada na Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai. No Brasil encontra-se presente na região amazônica, no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do país<sup>32, 33, 36, 75, 76, 77</sup>.

A doença no homem manifesta-se como lesão cutânea ulcerada, geralmente

única. Há relatos do seu envolvimento em invasões de mucosas e em casos de leishmaniose cutânea disseminada e de leishmaniose visceral, entretanto, esta espécie é de particular interesse médico devido a sua associação com uma forma incomum da doença, a leishmaniose cutânea difusa ou anérgica, um tipo de manifestação pouco freqüente e resistente ao tratamento convencional<sup>22, 32, 78, 79</sup>.

Roedores do gênero *Proechimys* são os hospedeiros primários do parasito e outros roedores (*Oryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*), assim como marsupiais e canídeos silvestres, são considerados hospedeiros secundários<sup>1, 80, 81</sup>.

Tem como principal vetor, *Bichromomyia flaviscutellata* considerado pouco antropofílico, de hábitos noturnos e vôo baixo. Eventuais infecções têm sido observadas em *Bi. olmeca nociva* e *Bi. reducta*, espécies de menor importância epidemiológica na transmissão do parasito<sup>66, 81, 82</sup>.

Segundo Gomes<sup>44</sup> (1992), o fato das fronteiras de *Le. amazonensis* terem se mostrado mais amplas que a Amazônia, e seu vetor demonstrado uma capacidade extraordinária em se adaptar a matas secundárias baixas, tipo capoeira e a outros ambientes modificados, impõem a necessidade de estudos sobre sua estrutura epidemiológica nessas situações.

### 1.3. Diagnóstico da leishmaniose tegumentar

O diagnóstico de LT inclui aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo freqüentemente necessária a associação de alguns desses elementos para se chegar ao diagnóstico conclusivo.

Clinicamente a suspeita baseia-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos obtidos durante a anamnese do paciente. Na dependência da resposta imunocelular do hospedeiro, da espécie de parasito e da complexa relação parasito-hospedeiro, a parasitose produz um amplo espectro de lesões, o que impõem dificuldades ao diagnóstico clínico<sup>10, 35, 83</sup>.

O diagnóstico de certeza se obtém pela demonstração do parasito, através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e ou indireta. O exame mais

---

realizado é a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por aspiração, escarificação ou biópsia, sendo que o sucesso no encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão <sup>35, 84, 85</sup>.

O parasito cresce relativamente bem em diversos meios de cultura, permitindo seu isolamento, porém, este é um procedimento que por exigir condições laboratoriais adequadas não está disponível em muitas áreas de ocorrência da parasitose <sup>10</sup>.

A inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*), embora permita o diagnóstico parasitológico, apresenta a desvantagem do longo tempo (2 a 9 meses) necessário para a evolução da lesão nesse animal.

A histopatologia varia de acordo com a espécie de parasito, a fase de evolução da lesão e o estado imunológico do portador sendo, portanto, difícil o diagnóstico nos casos em que não se evidencia o agente causal <sup>83, 84, 86</sup>.

O diagnóstico imunológico é feito através da intradermorreação de Montenegro (IDRM) e de reações sorológicas. A IDRM é uma reação de hipersensibilidade tardia, e é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LT, sendo também bastante útil em inquéritos epidemiológicos nas áreas endêmicas. Embora não discrimine se a infecção é recente ou pregressa, e também a espécie de *Leishmania* responsável pela lesão, a sensibilidade e a especificidade do teste variam entre 82 e 100%. Estima-se uma positividade de 84% e 100% nas formas cutâneas e mucocutâneas, respectivamente, e resultados negativos na forma cutânea difusa e nos casos de lesões com tempo de evolução inferior a 30 dias <sup>83, 84, 87, 88, 89</sup>.

Os métodos sorológicos apresentam sensibilidade em torno de 50 a 70%, e resultados negativos não excluem o diagnóstico de leishmaniose. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e os testes imunoenzimáticos (ELISA) são os mais utilizados, e podem auxiliar o diagnóstico precoce das lesões mucosas <sup>84, 90, 91</sup>. O teste de Western Blot que tem apresentado sensibilidade e especificidade superiores a esses métodos, é outra possibilidade diagnóstica <sup>92</sup>.

A RIFI é uma técnica bastante difundida, muito utilizada em estudos sobre leishmanioses, podendo auxiliar no diagnóstico dessas doenças, especialmente quando não detectado o parasito. Sendo grupo-específica, há possibilidade de

reações cruzadas especialmente com a LV e doença de Chagas <sup>35, 92</sup>.

Na LT apresenta resultados variáveis, quer pela reduzida antigenicidade do parasito ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Após o tratamento e a cura clínica, os títulos diminuem ou mesmo desaparecem em alguns meses, podendo ser úteis como controle de cura <sup>88, 91, 93, 94</sup>.

A reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction - PCR), técnica que permite a amplificação de seqüências de DNA parasitário, apresenta elevada sensibilidade (97%) na leishmaniose cutânea, chegando a 71% na forma mucosa quando o agente é *Le. braziliensis* <sup>95</sup>. Permite também a identificação específica do parasito, porém, tem seu uso limitado face às exigências durante o procedimento e custo relativamente elevado <sup>10, 83, 96, 97</sup>.

#### 1.4. Os flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos hematófagos pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae.

Constituem um grupo de insetos com registros de fósseis de cerca de 120 milhões de anos, conferindo-lhes uma origem bastante antiga e primitiva <sup>98</sup>.

Cerca de 900 espécies estão distribuídas por todos os continentes, e na atualidade, na América, são conhecidas aproximadamente 470 espécies, metade das quais ocorre no Brasil <sup>13, 14, 15</sup>.

As diferentes espécies de flebotomíneos possuem habitats preferenciais, com algumas vivendo nas partes altas das árvores, com ecologia arbórea definida, e outras que são encontradas ao nível do solo, demonstrando uma ecologia própria. Evidentemente, em cada um desses níveis existe uma fauna diferente que pode definir o hábito alimentar do inseto. A maior diversidade das espécies de flebotomíneos encontra-se nas florestas tropicais, embora estejam presentes em cavernas e ambientes antrópicos, rurais ou urbanos <sup>24, 44, 99, 100, 101</sup>.

São insetos pequenos, holometabólicos, de 1 a 3 mm de tamanho, de cor clara, com o corpo recoberto de pêlos. Seu vôo é curto e baixo, saltitante, podendo se deslocar até cerca de 1 km, com a maioria apresentando dispersão de até 250

metros<sup>24, 102</sup>. Seu ciclo biológico apresenta quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto<sup>103</sup>.

As formas imaturas, de hábitat terrestre, desenvolvem-se em criadouros constituídos por solos úmidos, ricos em matéria orgânica, ao abrigo da luz direta, entre raízes expostas, embaixo de folhas caídas e de pedras, em gretas de rochas, tocas de animais e nos ambientes antrópicos como chiqueiros, galinheiros, canis, estábulos ou outros ecótopos nos quais as condições adequadas se fazem presentes<sup>99, 104, 105</sup>.

As formas aladas tendem a não se afastarem de seus criadouros, permanecendo em repouso e abrigadas em locais onde possam se proteger das bruscas mudanças ambientais. Utilizam como abrigos, tocas de animais, troncos de árvores, espaços existentes entre folhas de arbustos e aquelas caídas ao chão, sendo capazes de adaptarem-se a baixos graus de umidade e elevadas temperaturas<sup>17, 102, 105</sup>.

Ambos os sexos necessitam de açúcares em sua dieta, porém, somente as fêmeas são hematófagas, necessitando da alimentação sangüínea para maturação dos ovos, podendo o repasto sangüíneo ser realizado em várias espécies de animais vertebrados, inclusive o homem. Já foi relatado o encontro de machos com sangue no tubo digestivo<sup>106, 107</sup>.

A atividade hematofágica das fêmeas é predominantemente noturna, porém, algumas espécies podem exercê-la durante o dia<sup>100, 108</sup>. Constituem um grupo de insetos bastante indesejáveis, pois apresentam uma picada dolorosa que pode desencadear, em algumas oportunidades, graves formas de reações alérgicas<sup>109, 110</sup>.

A importância médica dos flebotomíneos deve-se ao fato de que, além de serem vetores de protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses, são incriminados como vetores de arboviroses e bartonelose. Foram também isolados do tubo digestivo desses insetos, tripanossomas pertencentes aos subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* de importância ainda não esclarecida para o homem<sup>111, 112</sup>.

O eclético hábito alimentar desses insetos e a possibilidade de serem hospedeiros de mais de 150 espécies de microorganismos, além das leishmânias,

poderia possibilitar a transmissão entre diferentes vertebrados, necessitando, porém, mais estudos para realmente incriminá-los como vetores <sup>113</sup>.

Para a compreensão da história natural dos parasitos por eles transmitidos, assim como para incriminar uma espécie de flebotomíneo como vetora de *Leishmania*, além do isolamento repetitivo do parasito no flebotomíneo, encontram-se os aspectos relacionados ao conhecimento da diversidade de espécies na área de ocorrência da doença, a abundância relativa, a determinação do grau de antropofilia e zoofilia das espécies e sua distribuição ecológica <sup>13, 114</sup>.

Dentre os flebotomíneos americanos, 60 espécies estão envolvidas na transmissão das leishmanioses <sup>13, 14, 101, 115</sup>. Dessas, algumas são comprovadamente vetoras, uma vez que apresentam distribuição geográfica coincidente com a da doença, alta densidade, capacidade de se infectar e transmitir o agente etiológico, são antropofílicas e se relacionam na natureza, com os reservatórios naturais do parasito. Outras espécies são incriminadas por evidências epidemiológicas, acrescidas ou não da identificação da infecção natural pelos parasitos <sup>13, 14</sup>.

## 1.5. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar

É encontrada em 88 países no mundo e cerca de 350 milhões de indivíduos estão sob o risco de adquirir a doença. A LT está presente na maioria dos países da América, com o Chile, Uruguai e Canadá não apresentando relato de casos. Na Oceania, considerada área indene da doença, observou-se recentemente a ocorrência de parasitismo em cangurus vermelhos da Austrália <sup>17, 25, 116, 117</sup>.

Estima-se que 90% dos casos ocorram em sete países: Brasil e Peru no Novo Mundo e Irã, Síria, Afeganistão, Algéria e Arábia Saudita no Velho Mundo <sup>8</sup>.

A LT no Brasil vem apresentando nos últimos anos um processo de expansão em sua área geográfica e incidência, chamando a atenção a ocorrência da parasitose em ambientes urbanos <sup>47, 118, 119</sup>.

No Brasil, todos os estados já registraram casos autóctones da doença, com maior concentração deles nas regiões Norte e Nordeste, e estatísticas oficiais mostram crescimento progressivo e registros ocasionais de surtos <sup>26, 35</sup>.

A região Centro-Oeste vem apresentando expansão da doença, figurando como a segunda maior região em coeficiente de detecção <sup>120</sup>.

O padrão clássico de transmissão é o silvestre, no qual o homem, considerado um hospedeiro acidental, adquire o parasito ao adentrar seu foco natural onde se encontram os animais silvestres e os flebotomíneos. Nessa situação, a doença atinge predominantemente o sexo masculino e em idade produtiva, podendo ser considerada uma doença ocupacional <sup>5, 36</sup>.

Com a grande devastação das matas, observa-se que os focos de LT permanecem restritos a resíduos de cobertura vegetal primitiva em áreas de colonização antiga, merecendo atenção a ocorrência de surtos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas, como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença <sup>44, 76</sup>.

Menciona-se também, o incremento do número de casos em pessoas que fazem incursões às matas com finalidades de lazer, como turistas e pescadores amadores <sup>121</sup>.

A crescente devastação das florestas impôs às populações de vetores e hospedeiros silvestres um processo de adaptação aos ambientes extraflorestais, facilitado pela maior oferta de alimento e abrigo, alterando a condição de exposição do homem ao parasito <sup>5, 44</sup>.

Desta forma, em ambientes ecologicamente alterados, algumas espécies de flebotomíneos estariam mais envolvidas com a transmissão periurbana ou peridomiciliar, permitindo também a ocorrência de LT em cães e eqüídeos, sugerindo a participação desses animais como reservatórios secundários das espécies de *Leishmania*, necessitando ainda a comprovação de que esses animais, e também o homem sejam capazes de infectar os insetos vetores e assim manter o parasito na ausência de seus hospedeiros primários <sup>36, 122</sup>.

Deve-se considerar ainda, dentre os fatores responsáveis pelo incremento de casos da doença em determinadas áreas, a situação sócio-econômica com

significativo aumento no número de pessoas carentes onde as condições precárias de vida e de trabalho aliadas à ausência de educação ambiental são favorecedoras do acúmulo de material orgânico no peridomício e da proliferação de roedores em suas proximidades, o que contribui para o processo adaptativo de algumas espécies de vetores e de animais sinantrópicos <sup>45, 122</sup>.

Pela sua complexidade epidemiológica, a LT é uma parasitose de difícil controle e as medidas devem ser específicas de acordo com as peculiaridades de cada área de ocorrência, com destaque para o diagnóstico e tratamento precoce, a identificação da espécie de *Leishmania* circulante na área e o conhecimento das áreas de transmissão, a fim de reduzir o contato homem- vetor <sup>123</sup>.

## 1.6. As leishmanioses em Mato Grosso do Sul

O Estado do Mato Grosso do Sul, situa-se ao sul da Região Centro Oeste do Brasil. Suas coordenadas geográficas compreendem latitude 19°12'03" e longitude 57°35'32". Possui área total de 358.158,7km<sup>2</sup> e a população, até o ano 2000, era de 2.198.640 habitantes. O clima predominante na região é o tropical quente e semi-úmido, marcado por chuvas no verão e períodos secos durante o inverno, com temperaturas podendo variar conforme a unidade de relevo local. O índice pluviométrico anual do Estado é de 1.500mm <sup>124</sup>.

É composto por 78 municípios, estando estes distribuídos por 4 Mesorregiões: Centro Norte, Leste, Pantanal Sul Mato-Grossense e Sudoeste de Mato Grosso do Sul. Com a Bolívia limita-se a oeste. Com a República do Paraguai faz fronteira a oeste e ao sul. No território nacional, limita-se a leste com os Estados de Minas Gerais e São Paulo e ao sul com o Estado do Paraná. Ao norte, limita-se com os Estados de Mato Grosso e Goiás <sup>125</sup>.

O Pantanal e o Planalto Sedimentar do Paraná representam as duas unidades de relevo presentes no Estado de Mato Grosso do Sul. A região do Planalto Sedimentar que ocupa a porção leste do Estado, é constituída de chapadões, planaltos e vales, com altimetrias variando de 250 a 850 m. A vegetação primitiva era constituída basicamente de diversas formações de Savana (Cerrado) e

de Floresta Estacional Semidecidual. Devido à intensa ação antrópica, os remanescentes da vegetação nativa encontram-se atualmente reduzidos e bastante pulverizados, observando-se nos locais devastados, extensas áreas de cultivo de pastagem e lavoura.

Nas áreas de planície aluvial ocorre o chamado complexo Pantanal, onde o revestimento vegetal é formado pela combinação de cerrados e campos, com predominância da vegetação de campos, apresentando diversidade de espécies faunísticas e uma flora rica e variada.

Em Mato Grosso do Sul, as leishmanioses constituem importantes problemas de saúde pública, tendo em vista a ampla distribuição geográfica, o crescente aumento no número de casos e a ocorrência de formas clínicas graves <sup>126, 127, 128</sup>.

A LV tem sua ocorrência registrada desde 1911, com o registro de casos esporádicos até a década de 80. Supõe-se que o primeiro caso humano autóctone dessa parasitose no Continente Americano, parasitologicamente comprovado, tenha se infectado na região de Porto Esperança, município de Corumbá <sup>129, 130</sup>, hoje área endêmica para a parasitose no Estado.

Casos esporádicos da doença em outros municípios foram relatados por Chagas e Chagas <sup>131</sup> (1938) e Oliveira <sup>132</sup> (1938), e na década de 40, foram registrados dois casos humanos, um em uma criança do município de Rio Brillante e o outro em adulto que na época trabalhava na ferrovia Bolívia-Brasil, também em Corumbá <sup>133</sup>, demonstrando a presença do parasito nessa região.

A partir de 1980, nesse município, iniciou-se a notificação dos primeiros casos humanos de LV. Este fato, aliado à ocorrência de cães com aspectos sugestivos da doença, levou a estudos na área com o intuito de conhecer componentes epidemiológicos da parasitose na região. A infecção canina encontrava-se disseminada na cidade e foi diagnosticada sorologicamente em 8,7% de 481 cães examinados <sup>134, 135</sup>. Dez anos depois, Santos et al. <sup>115</sup> (1998) ao realizarem um inquérito sorológico canino na região relataram 24% de positividade demonstrando a permanência da infecção.

Estudos conduzidos em animais silvestres, 11 raposas e 2 procionídeos (*Nasua nasua*), revelaram a infecção natural de um canídeo, *Cerdocyon thous*,

capturado a 3 km de distância de Corumbá. Assim como nos cães, o parasito foi isolado e identificado como *Leishmania (Le.) chagasi*<sup>134, 136</sup>.

Pesquisas referentes à fauna flebotomínea na cidade, constataram a presença de oito espécies, sendo as mais freqüentes *Lutzomyia cruzi*, seguida por *Lutzomyia forattinii* e *Evandromyia corumbaensis*, que foram encontradas tanto no peri quanto no intradomicílio, demonstrando as duas primeiras, elevada antropofilia e alta densidade populacional, o que levou os autores a sugerirem a participação destas duas espécies na veiculação do parasito na área<sup>137</sup>. Embora Santos et al.<sup>115</sup> (1998) ao encontrarem *Lu. cruzi* naturalmente infectada, tenham incriminado a espécie como vetora da LV em Corumbá, em 2003 foi assinalada a presença de *Lu. longipalpis* no município, acrescentando uma nova variável na epidemiologia da doença<sup>138</sup>.

A doença manteve-se restrita a esta área até 1995, quando iniciou sua expansão para municípios adjacentes. No ano de 1999, foram notificados 61 casos de LV, com 09 óbitos e 54% das notificações em crianças menores de 10 anos. Nesse período a doença abrangia 11 municípios, dentre os quais, Aquidauana e Anastácio, distantes 270 km de Corumbá<sup>128, 139</sup>.

Em estudo realizado no ano de 1999, no Assentamento Guaicurus, município de Bonito, Nunes<sup>140</sup> (2001) não detectou casos humanos de LV, porém, ao estudar a população canina encontrou 23,7% de cães reagentes e isolou o parasito *Le. (Le.) chagasi*. Através de ensaio imunoenzimático, foi observada uma prevalência para a infecção canina de 31,0%. Com a utilização de técnicas moleculares em amostras de creme leucocitário e aspirado de medula óssea, foi constatada a presença de cães infectados por *Le. (Le.) chagasi*, *Le. (Le.) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) sp* apontando para a possibilidade de ocorrência da infecção humana por esses agentes no Assentamento Guaicurus<sup>141</sup>.

Nos anos subseqüentes a parasitose continua seu processo de expansão e urbanização, atingindo 34 dos 78 municípios do Estado, ressaltando-se a ocorrência de uma epizootia canina, com diagnóstico conclusivo de casos autóctones de LV em cães na capital, Campo Grande, no ano de 1999<sup>142</sup>. Além disso, no ano de 2000, a

doença atinge, em caráter epidêmico, a cidade de Três Lagoas, município fronteira com o Estado de São Paulo <sup>143</sup>.

A fauna flebotomínea na cidade de Campo Grande passou a ser conhecida com os trabalhos de Oliveira et al.<sup>144</sup> (2003) que assinalaram na área urbana, a presença de *Lu. longipalpis*, espécie comprovadamente vetora de LV. Os autores chamaram a atenção para a ocorrência em simpatria, da espécie *Lu. cruzi*, que por evidências epidemiológicas, poderia estar implicada no ciclo de transmissão da LV em Corumbá e Ladário <sup>115, 137</sup>.

Em Campo Grande, no ano de 2002, surgiram as primeiras notificações de LV com a confirmação de 19 casos humanos autóctones, determinando a importância do processo de expansão e o caráter endêmico da parasitose no Estado <sup>145</sup>.

Atualmente, a capital, Campo Grande, detém o maior número de casos, tendo registrado, no ano de 2005, 184 casos da doença dentre os 264 ocorridos no Estado. No corrente ano, 74,2% dos casos confirmados pela Secretaria de Estado de Saúde, ocorreram em indivíduos que adquiriram a doença na capital, mantendo-se a morbidade como importante motivo de preocupação para a saúde pública, não só por sua expansão e incremento no número de casos, mas, também, por ser diagnosticada em populações rurais e urbanas, indivíduos jovens e adultos, em qualquer faixa etária <sup>143, 145</sup>.

Com a crescente expansão de investimentos econômicos em setores da agropecuária, mineração, do gasoduto e do turismo no Estado, grandes áreas encontram-se em franco processo de ocupação, ampliando a oferta de mão-de-obra e favorecendo a exposição de determinados grupos populacionais ao risco de contrair doenças como as leishmanioses, quando de sua penetração nessas áreas, as quais oferecem condições favoráveis à transmissão dessas parasitoses.

De acordo com dados da Secretaria de Estado da Saúde, casos de LT têm sido notificados desde 1975 e atingem praticamente seus 78 municípios, devendo-se, portanto, reconhecer a importância dessa parasitose no Estado.

A doença ocorre predominantemente no sexo masculino (72,2%), na faixa etária acima de 15 anos (90,5%), atingindo particularmente indivíduos com idade variando entre 20 e 64 anos (74,5%) e procedentes da área rural <sup>128, 146</sup>.

Apesar da ampla distribuição geográfica e do crescente número de casos, o

conhecimento de vários aspectos epidemiológicos da doença no Estado ainda é incipiente.

Nunes et al.<sup>127</sup> (1995) trabalhando na região da Boa Sorte, município de Corguinho, encontraram dentre 150 moradores, 32 pessoas reagentes ao teste intradérmico de Montenegro. Foram diagnosticados oito casos de doença ativa, sete pacientes eram portadores da forma cutânea e um apresentava comprometimento mucoso com destruição de septo nasal. As lesões, em atividade ou cicatriciais, localizavam-se em sua maioria, nas partes descobertas do corpo.

A doença ocorreu em indivíduos adultos, de ambos os sexos, com idade acima de 20 anos, havendo predomínio de casos no sexo masculino.

As matas, cerrados e cerradões da área estudada eram locais utilizados pelos pacientes para suas atividades de desmatamento e eventualmente, caçadas durante o período noturno. As mulheres que apresentaram a doença tinham como justificativa a realização de tarefas domésticas, como lavagem de roupas e utensílios à margem de córrego circundado por mata nativa, e também, relatavam cortar lenha ao entardecer em área de cerrado.

Galati et al.<sup>60</sup> (1996) em estudos da fauna flebotômica da área, relataram a ocorrência de 26 espécies, com predomínio de *Ny. whitmani* em todos os ecótopos pesquisados, porém, com inexpressivo número de espécimes capturados no interior do domicílio. A esta espécie foi atribuído o papel de vetora de LT, em decorrência de sua elevada antropofilia, atividade predominante nas primeiras três horas da noite, aliado ao encontro de um espécime com flagelados no intestino médio e posterior em uma área em que o parasito isolado dos casos humanos foi identificado como *Le. (Vi.) braziliensis*.

Em um estudo retrospectivo de 160 casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante o período de 1976 a 1999, Noguchi<sup>147</sup> (2001) constatou que a maioria dos pacientes apresentou úlcera cutânea única, com a doença acometendo mais o sexo masculino, na faixa etária de 31 a 40 anos e trabalhadores rurais, concluindo que a epidemiologia e a clínica foram semelhantes às encontradas em outras regiões do país.

No município de Bonito, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, Nunes<sup>140</sup> (2001) diagnosticou sete casos de LT em moradores do Assentamento

---

Guaicurus e um ocorrido em indígena Kadiwéu procedente de uma região denominada Campo dos Índios, município de Porto Murtinho. Todos os pacientes eram do sexo masculino, com idade entre 19 e 48 anos, e apresentaram a forma cutânea da parasitose, com lesões ulceradas únicas ou múltiplas. O parasito foi isolado e identificado como *Le. (Vi.) braziliensis*.

Assim como no município de Corguinho <sup>127</sup>, a constatação de que os casos ocorreram em adultos, do sexo masculino, que trabalhavam ou freqüentavam as matas durante a noite, a ausência da doença em mulheres, crianças e animais domésticos, e a presença predominante de *Ny. whitmani* na área <sup>101</sup>, sugeriram que a transmissão da LT na área tinha o caráter extradomiciliar.

Pode-se dizer, portanto, que o padrão de transmissão da LT em Mato Grosso do Sul, tem caráter ocupacional, atingindo o homem quando este entra em contato com o foco natural da parasitose, no qual circulam seus agentes etiológicos, vetores e reservatórios.

## 1.7. Justificativa

A expansão progressiva das leishmanioses, seja pela maior ação antrópica como também pelas mudanças em seus perfis epidemiológicos, com a adaptação de seus agentes etiológicos a novos hospedeiros e conseqüente introdução no ambiente domiciliar, vem sendo considerado um modelo de doença emergente.

No Estado de Mato Grosso do Sul, os escassos estudos realizados relatam que o agente causal da LT tem sido identificado como *Le. (Vi.) braziliensis*, contudo ainda existe pouca informação sobre a etiologia da doença em suas diferentes áreas de ocorrência.

O Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFMS, pela infra-estrutura disponível, vem realizando, desde 1983, o diagnóstico parasitológico das leishmanioses e conta com uma demanda contínua de casos, os quais são atendidos independentemente da procedência ou da instituição de saúde solicitante.

Assim sendo, o referido laboratório foi procurado para a realização do diagnóstico de LT em pacientes procedentes do município de Bela Vista que haviam realizado treinamento militar.

Sabendo-se que dentre os diversos fatores a serem considerados na epidemiologia da LT encontram-se os treinamentos militares em áreas florestais, e considerando: a característica de surto da doença entre os militares; a endemicidade da LT em Mato Grosso do Sul; a necessidade do diagnóstico etiológico e da caracterização clínica dessa casuística; a necessidade de se conhecer aspectos epidemiológicos locais; a necessária identificação das espécies de flebotomíneos envolvidas; e que as estratégias de controle dessa parasitose dependem da natureza da transmissão observada em cada foco da doença, os estudos propostos visam fornecer informações que resultem em subsídios para o planejamento e desenvolvimento de ações que possam reduzir o risco de transmissão da LT na área estudada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar aspectos epidemiológicos relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar em área militar no município de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✧ Descrever os casos humanos ocorridos na área;
- ✧ Isolar e identificar a espécie de parasito encontrada;
- ✧ Identificar a fauna flebotomínea em área de mata e em abrigos de animais domésticos;
- ✧ Observar a diversidade, índice de abundância e sazonalidade para as espécies de flebotomíneos da área;
- ✧ Identificar possíveis espécies vetoras e investigar a infecção natural por *Leishmania*;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

O município de Bela Vista está localizado na região sudoeste de Mato Grosso do Sul, na micro-região geográfica de Bodoquena (Fig. 1). Apresenta uma área de 5.315 km<sup>2</sup> e coordenadas geográficas: LS: 22°06'32" e LW: 56°31'16". Seus limites são: ao Norte, com a cidade de Jardim; ao Sul, com a República do Paraguai, a Leste com o município de Antônio João e a Oeste, com Caracol. É banhada pelo rio Apa, fazendo fronteira com o distrito de Bella Vista, localizado em território paraguaio. Sua sede está a uma altitude de 180 m acima do nível do mar e dista 349 km da Capital, Campo Grande<sup>148</sup>.

De acordo com o IBGE<sup>125</sup> (2002), da cobertura vegetal original registrada para a região, restam apenas algumas poucas formações do tipo Floresta Estacional Semidecidual. Predominam nas terras do município a vegetação do tipo formações contato savana, floresta estacional e do tipo savana (cerrado). Atualmente, 80% da área do município estão ocupados com agricultura (lavouras temporárias) e pecuária (pastagens nativas e cultivadas).

##### 3.1.1. Características locais

O 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec), é uma unidade militar localizada desde 1906 na área urbana do município de Bela Vista, com 2.200 hectares de área total. A área utilizada para as atividades de instrução é contemplada por uma vegetação heterogênea que compreende áreas de campo sujo, cerradão, mata ciliar e brejo, todas com um grau de antropização bastante acentuado.

Ocorrem áreas sujeitas a alagamento por estarem nas proximidades do córrego Candelão, com uma vegetação ciliar totalmente descaracterizada.

Possui uma área denominada Granja, com 101 ha, onde se encontram duas residências praticamente desabitadas, uma pocilga e um galinheiro semi-abandonado.

### 3.1.2. Pacientes

Os pacientes eram militares do 10º RCMec, que apresentaram lesões cutâneas após o período de instrução e foram consultados no Hospital Geral de Campo Grande, com encaminhamento de material biológico ao Laboratório de Parasitologia da UFMS para diagnóstico parasitológico.

### 3.1.3. Pontos de captura

Na Fig. 2 encontra-se um mapa da área de instrução, onde foram selecionados oito sítios para as capturas de flebotomíneos, de acordo com a frequência de sua utilização e a permanência dos militares durante o período de treinamentos:

**Pista de cordas:** caracteriza-se como uma área sujeita a alagamento por estar nas proximidades do córrego Candelão. A vegetação arbórea neste local é densa proporcionando sombreamento e umidade. O entorno é dominado por um estrato gramíneo, a maioria das espécies arbustivas e arbóreas registradas são invasoras ou oportunistas, descaracterizando completamente o entorno do remanescente de mata (Fig. 3).

**Pista de Primeiros Socorros, Base do Primeiro Esquadrão e Pista de Sobrevivência:** nos dois primeiros pontos existe uma área aberta constituindo uma clareira, local de instrução dos soldados iniciantes. Em todos esses locais, o entorno é constituído por uma vegetação densa com predomínio do estrato arbóreo com espécies caducifólia que propiciam o acúmulo de matéria orgânica pela decomposição de folhas e restos vegetais depositados no solo (Figs. 4, 5 A,B e 6 A,B).

**Áreas de acampamento:** os dois pontos são próximos a mata ciliar do córrego Candelão. Uma vegetação ciliar totalmente descaracterizada predominando espécies pioneiras e secundárias que se desenvolvem às margens do córrego. Outro aspecto que chama a atenção é a quantidade de areia e outros detritos que

são carregados para dentro do córrego propiciando a formação de bancos de vegetação com espécies invasoras (Fig. 7 A,B).

**Galinheiro e pocilga:** o entorno neste local é constituído por uma mata ripária seguido de uma área brejosa com vegetação herbácea e arbustiva. Na área da granja observa-se uma grande quantidade de detritos oriundos de fezes dos suínos que ficam retidas nas proximidades da pocilga. As casas abandonadas, os galpões de olaria e o próprio galinheiro abandonado contribuem para o acúmulo de detritos propiciando a propagação e crescimento de espécies consideradas invasoras de áreas abertas (Fig. 8 A,B).

Amostraram-se também as baias existentes nas dependências do Regimento (Fig. 9).

A descrição das metodologias e os resultados deste estudo encontram-se dispostos em cinco artigos científicos, sendo que o primeiro já foi publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2006; 39: 43-46.

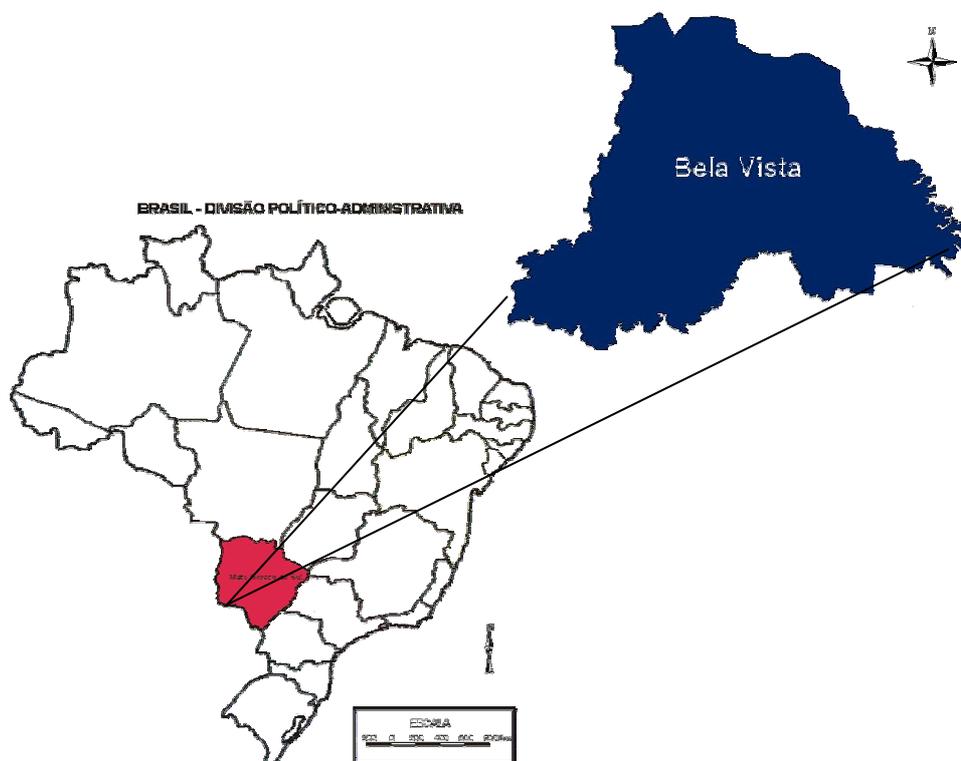


Figura 1- Localização do município de Bela Vista,

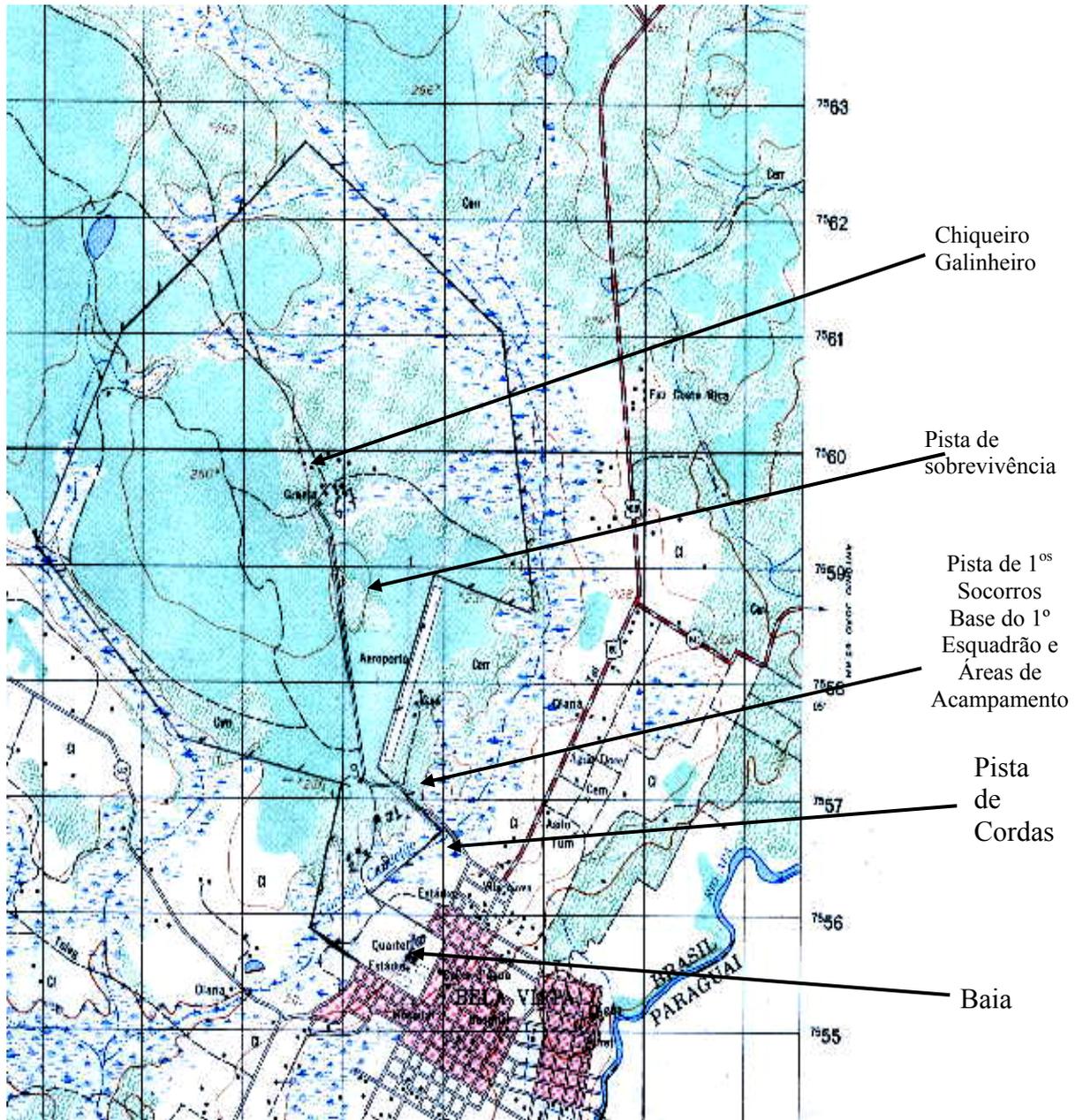


Figura 2- Mapa da área do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado e respectivos pontos de captura de flebotomíneos, Bela Vista, MS.



Figura 3- Vista do ponto de captura Pista de Corda, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 4- Vista da Pista de Primeiros Socorros no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 5 A e B - Aspecto geral do ponto de captura Base do Primeiro Esquadrão, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 6 A e B - Aspectos da mata no ponto de captura Pista de Sobrevivência, 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 7 A e B - Vista geral das áreas de Acampamento no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 8 A e B - Vista geral da pocilga e do galinheiro na área da Granja do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 9- Aspecto geral das baias no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.

## **RESULTADOS**

## ARTIGO 1

**Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Publicado: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical  
2006; 39 (1): 43-46.**

## Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval<sup>1</sup>, Elisa Teruya Oshiro<sup>1</sup>,  
Elisa Cupollilo<sup>2</sup>, Ana Cristina Camargo de Castro<sup>3</sup> e Tulia Peixoto Alves<sup>4</sup>

### RESUMO

São relatados nove casos de leishmaniose tegumentar americana ocorridos no ano de 2001 em uma unidade de treinamento militar localizada no município de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul. Parasitas obtidos de lesões de seis pacientes foram isolados em cultura e posteriormente identificados através da análise de isoenzimas como sendo *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Esta é a primeira evidência da presença desta espécie de parasita em Mato Grosso do Sul.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania amazonensis*. Mato Grosso do Sul.

### ABSTRACT

Nine cases of American tegumentary leishmaniasis were reported at a Training Military Unit located in Bela Vista City, State of Mato Grosso do Sul. Parasites obtained from lesions of six patients were isolated in culture media followed by identification, through isoenzymes analysis, as being *Leishmania amazonensis*. This is the first evidence of the presence of the parasite in Mato Grosso do Sul.

**Key-words:** American tegumentary leishmaniasis. *Leishmania amazonensis*. Mato Grosso do Sul State.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está entre uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, a ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades referentes tanto ao diagnóstico como ao tratamento das mesmas<sup>2,14</sup>. Esta enfermidade apresenta um caráter antroponótico, sendo causada por diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidas ao homem através da picada de insetos vetores hematófagos, os flebotomíneos. Existem pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas e que estão associadas com a doença humana, sendo que no Brasil *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas<sup>8</sup>.

A severidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, muitas vezes mutilantes, como a leishmaniose mucocutânea.

Ressaltam-se, ainda, as dificuldades inerentes ao controle dessas parasitoses, decorrentes principalmente de suas complexas características epidemiológicas<sup>2,7,9,14</sup>.

No Brasil, a LTA está amplamente distribuída, tendo registro de casos autóctones em todos os estados da federação<sup>17</sup>. Em Mato Grosso do Sul, a LTA apresenta ampla distribuição<sup>20</sup>, sendo registrados no ano de 2001, 394 casos da doença e até o mês de abril de 2002, somam-se 126 notificações<sup>18,19</sup>. Casos da doença são notificados em todos os municípios, com maior incidência nos municípios de Aquidauana, Bodoquena, Bonito, Campo

1. Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2. Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 3. Hospital Geral de Campo Grande, Campo Grande, MS. 4. Curso de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Endereço para correspondência: Dra. Maria Elizabeth M.C. Dorval. Depto. de Patologia/CCBS/UFMS, Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS.

Tel: 55 67 3345-7369

e-mail: bethparasito@nin.ufms.br

Recebido para publicação em 1/9/2004

Aceito em 29/10/2005

Grande, Coxim e Nioaque<sup>25</sup>. Apesar da parasitose ser endêmica no estado, poucos estudos clínicos e epidemiológicos, que permitam conhecer os fatores envolvidos na incidência humana dessa doença, têm sido realizados na região.

São apresentados nove casos de LTA ocorridos em unidade de treinamento militar no município de Bela Vista, MS, onde a doença tem sido relatada de forma autóctone desde 1984 (C Montani: comunicação pessoal, 2003), no entanto, sem qualquer estudo sobre o agente etiológico, seus vetores e outros hospedeiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Descrição da área.** O município de Bela Vista situa-se na parte sudoeste de Mato Grosso do Sul, ocupando uma área de 5.315km<sup>2</sup> e dista da capital, Campo Grande, pela rodovia BR 060, 355km. Seus limites são: ao Norte, com a cidade de Jardim; ao Sul, com a República do Paraguai, a Leste com o município de Antônio João e a Oeste, com Caracol. Suas coordenadas geográficas são latitude (S): 22°06'32" e longitude (W): 56°31'16". É banhada pelo rio Apa, fazendo fronteira com o distrito de Bela Vista, localizado em território paraguaio. De sua área total, 0,76% é ocupada pela zona urbana e 96,2% pertence à área rural<sup>24</sup>. O 10º Regimento de Cavalaria Mecanizada (RCMEC), localiza-se nessa cidade desde 1906, e detém uma área de aproximadamente 200 hectares, margeada pelo Córrego Candelão, onde cerca de 50 hectares são utilizados como centro de instrução para atividades de treinamento diurno e noturno. A vegetação predominante é constituída de mata tropical nativa, cerrado não muito denso e cerradões.

**Pacientes.** Os pacientes, em sua maioria soldados do efetivo variável, eram procedentes de Mato Grosso do Sul, sendo cinco de Bela Vista e quatro de outro município. O grupo esteve no local de treinamento nos meses de abril e maio, onde permaneceu por cinco dias e quatro noites no interior da mata. Posteriormente, foram encaminhados ao Hospital Geral de Campo Grande com lesões cutâneas, quando este serviço solicitou ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, avaliação diagnóstica para LTA.

**Diagnóstico laboratorial.** O diagnóstico foi realizado através do exame parasitológico de material obtido por biópsia da borda da lesão e cultura em meio Nicolle, Nevy e McNeal (NNN) com fase líquida Schneider's medium (pH 7.2 e 10% soro fetal bovino). **Tratamento.** Os pacientes foram tratados com Antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), 20mg Sb<sup>3+</sup>/kg/dia, via endovenosa com 250ml de soro glicosado a 5%, durante 30 dias.

**Identificação dos parasitas.** A identificação da espécie de *Leishmania* isolada foi realizada pela técnica de eletroforese de enzimas em gel de agarose empregando protocolo previamente descrito<sup>4</sup>, utilizando 12 loci enzimáticos (G6PDH: glicose 6 fosfato desidrogenase/1.1.1.49, MDH: malato desidrogenase/1.1.1.37, IDH-NADP: isocitrato desidrogenase/1.1.1.42, ME: enzima malica/1.1.1.40, 6PGDH: 6 fosfo gluconato desidrogenase/1.1.1.43, PGM: fosfoglucomutase/1.4.1.9, NH1/NH2: nucleotidase/3.2.2.1, PEPD: prolina dipeptidase/3.4.13.9, MPI: manose fosfato isomerase/5.3.1.8, ACON: aconitase/4.2.1.3 e GPI: glicose fosfato isomerase/5.3.1.9).

## RESULTADOS

A LTA foi diagnosticada em nove (64,3%) de quatorze pacientes encaminhados ao laboratório. Os aspectos clínicos e laboratoriais são apresentados na Tabela 1. O tempo de evolução variou de quinze a noventa dias. Todos os pacientes apresentaram cura clínica ao final do tratamento, embora três deles tivessem apresentado efeitos colaterais que foram monitorados e não prejudicaram a terapêutica.

Ao exame parasitológico direto, oito pacientes apresentaram formas amastigotas no material examinado e cultura positiva após sete dias. Somente um caso que não apresentou formas amastigotas nos esfregaços por aposição, teve a confirmação diagnóstica através do cultivo, após vinte e um dias da semeadura.

Das nove amostras com diagnóstico positivo, seis foram caracterizadas como *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e as outras três foram inviabilizadas por contaminação das culturas.

Tabela 1 - Aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes com leishmanioses tegumentar americana procedentes de Bela Vista, MS, 2001.

Paciente	Idade	Local da lesão	Aspecto clínico da lesão	Exame direto	Cultura	Identificação
1	24	antebraço	ulcerocrostosa	+	C	NI
2	20	punho	ulcerada	+	+	<i>Leishmania amazonensis</i>
3	20	nuca	ulcerada	+	+	<i>Leishmania amazonensis</i>
4	20	face	eritematodular	+	+	<i>Leishmania amazonensis</i>
5	20	antebraço	ulcerada	+	C	NI
6	20	punho	ulcerada	+	+	<i>Leishmania amazonensis</i>
7	22	orelha	ulcerocrostosa	+	+	<i>Leishmania amazonensis</i>
8	40	punho	ulcerada	+	C	NI
9	20	antebraço	ulcerada	-	+	<i>Leishmania amazonensis</i>

C: contaminada NI: não identificada

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que casos autóctones de LTA no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, Brasil, estão relacionados com a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Embora a infecção humana por esta espécie de parasita não seja considerada freqüente, a mesma tem sido identificada nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil<sup>12 9 10 11 13 23</sup>.

A região Centro-Oeste ocupa o terceiro lugar dentre as regiões brasileiras em incidência de LTA e o primeiro em crescimento da doença, segundo dados do Ministério da Saúde<sup>16 17</sup>. Apesar da ampla distribuição da doença em Mato Grosso do Sul, pouco se conhece sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da mesma no Estado e até o momento, somente *L. (L.) braziliensis* foi identificada como agente etiológico de LTA na região<sup>21</sup>. Sabe-se, contudo, que a distribuição das espécies de *Leishmania* está condicionada à presença dos vetores, de seus reservatórios ou de ambos; e a infecção do homem depende de suas relações com a cadeia de transmissão do parasita<sup>211</sup>.

Levantamentos da fauna flebotomínea realizados em algumas áreas de Mato Grosso do Sul têm determinado que *Lutzomyia whitmani* é a espécie mais abundante no Estado<sup>56</sup>, fato este que coincide com os achados de infecção por *L. (V.) braziliensis*. Ainda não existem estudos sobre a fauna flebotomínea local, porém, há relato do encontro de *Lu. flaviscutellata*, espécie vetora de *L. (L.) amazonensis*, em Campo Grande<sup>12</sup> e no município de Dourados (Cristaldo G: comunicação pessoal, 1997). Assim como em outras áreas, esta espécie pode estar participando do ciclo de transmissão da LTA em Bela Vista, tendo em vista o tipo de cobertura vegetal predominante e também, a presença de animais tais como, pequenos roedores, marsupiais, primatas e carnívoros que, segundo os militares, freqüentemente são vistos nos locais de treinamento e que poderiam estar atuando como possíveis reservatórios do parasita<sup>13</sup>.

A predominância das lesões na parte superior do corpo pode ser explicada pelo tipo de atividades desenvolvidas nos treinamentos, em contato direto com o solo no período noturno, ou ainda, pelo pernoite dos militares na mata.

Em face da necessidade de elucidação das características epidemiológicas do parasita na área, impõe-se a realização de uma investigação relativa à identificação de vetores e de possíveis reservatórios, sendo isto objeto de um trabalho dos autores.

Destaca-se o fato de que, a despeito do incremento do número de casos e de municípios com a doença, os serviços de diagnóstico mostram deficiência de capacitação e de infraestrutura necessárias à resolução da doença, prejudicando assim o diagnóstico e o conhecimento de fatores clínicos e epidemiológicos da doença no estado.

O presente relato amplia o conhecimento sobre *L. amazonensis*, sua distribuição em território nacional, revestindo-se de importância, principalmente pelo fato desta espécie estar relacionada com uma variedade de formas clínicas<sup>5</sup>, estando comumente associada a casos de leishmaniose cutânea difusa, de difícil cura com qualquer forma de quimioterapia<sup>12 15</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos às técnicas de laboratório Geucira Cristaldo e Hilda Carlos da Rocha, pelo apoio técnico no diagnóstico e isolamento dos parasitas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Fontes CJ, Melo MN. Typing of *Leishmania* from human sample from Mato Grosso State by DNA hybridization. In: Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, MG p. 43, 1999.
2. Ashford RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30: 1269-1281, 2000.
3. Barral A, Pedral Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Barral Neto M, Carvalho EM, Jonhson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil; evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-546, 1991.
4. Cupolilo E, Grimaldi JrG, Momen H. A general classification of the New World Leishmanias using numerical zootaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50: 296-311, 1994.
5. Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Cristaldo G, Rocha HC, Gonçalves-Andrade RM, Naufel G. Attractiveness of black Shannon trap for Phlebotomines. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 641-647, 2001.
6. Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. Study of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 30: 115-128, 1996.
7. Gomes AC. Perfil Epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 67: 55-60, 1992.
8. Grimaldi Jr G, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serademe analysis using monoclonal antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 270-287, 1987.
9. Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the world. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 687-725, 1989.
10. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Carvalho-Pinto CJ, Mangrich IE, 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 Tropica* 74: 89-93, 2000.
11. Lainson R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 47-56, 1985.
12. Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 11: 29-40, 1997.
13. Lainson R, Shaw JS. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W, Killick-Kendrick R (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol I, Academic Press, London, p.1-120, 1987.
14. Marzochi MCA. Leishmaniose Tegumentar no Brasil. In: *Grandes Endemias Brasileiras*, Editora Universidade de Brasília, Brasília, 1989.
15. Marzochi MCA, Marzochi KBE. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública* 10: 359-375, 1994.
16. Ministério da Saúde. Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 1997.
17. Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2000.

Dorval MEMC cols

---

18. Ministério da Saúde. Relatório de Incidência, Sistema Nacional de Agravos de Notificação, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2001.
19. Ministério da Saúde. Relatório de Incidência, Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2002.
20. Noguchi RC. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo de casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul durante o período de 1976 a 1999. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz/ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2001.
21. Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Araújo LB, Hans Filho G, Espíndola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Serafine LN, Santos D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul- estudos na população humana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28: 185-193,1995.
22. Oliveira AG. Estudo de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Tese de Mestrado, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
23. Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CME, Degreve W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting patients with American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Minas Gerais, southeast Brazil. Acta Tropica 72: 251-258, 1999.
24. Secretaria Municipal de Saúde. Plano Municipal de Saúde de Bela Vista, Bela Vista, MS, 1997 a 2001.
25. Secretaria de Estado de Saúde, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) Campo Grande, MS, 2003.

---

## ARTIGO 2

**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de área de leishmaniose tegumentar associada a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

**A ser submetido à publicação**

**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de área de leishmaniose tegumentar associada a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

*Sand flies (Diptera:Psychodidae) of tegumentary leishmaniasis area due to Leishmania (Leishmania) amazonensis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil*

Maria Elizabeth C. Dorval<sup>1</sup>, Geucira Cristaldo<sup>1</sup>, Hilda Carlos da Rocha<sup>1</sup>, Tulia Peixoto Alves<sup>2</sup>, Murilo Andrade Alves<sup>2</sup>, Elisa Teruya Oshiro<sup>1</sup>, Alessandra Gutierrez de Oliveira<sup>1</sup>, Reginaldo Peçanha Brazil<sup>3</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>

**Resumo:** Devido a recente ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar (LT) associada a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul e a falta de informação sobre seus vetores, foram realizadas capturas de flebotomíneos no período de fevereiro de 2004 a janeiro de 2006. Foram identificados 808 espécimes pertencentes a 17 espécies de Phlebotominae: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Brumptomyia avellari*, *Br. brumpti*, *Evandromyia aldafalcaoae*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. evandroi*, *Ev. lenti*, *Ev. teratodes*, *Ev. termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia christenseni*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia punctigeniculata*, *Psathyromyia shannoni* e *Sciopemyia sordellii*. As capturas foram realizadas com armadilhas de Shannon e armadilhas automáticas luminosas tipo CDC em ambiente de mata e em abrigos de animais domésticos. A diversidade e abundância das espécies foram analisadas com os espécimes capturados nas armadilhas automáticas luminosas. Os índices de diversidade em ambiente de mata foram mais altos (1,2 a 1,8) que nos abrigos de animais (0,1 a 1,4), onde apenas duas espécies foram capturadas. Pelo índice de abundância das espécies padronizado (IAEP), as espécies mais abundantes na área de mata foram *Br. brumpti*, *Br. avellari* e *Ev. lenti*, e nos abrigos de animais, *Ev. lenti* e *Lu. longipalpis*. Quanto ao ritmo horário noturno, as médias horárias das espécies coletadas demonstraram predomínio durante as três primeiras horas. Destaca-se a presença de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata*, espécies comprovadamente vetoras de *Leishmania chagasi*, *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis*, respectivamente. A presença de *Evandromyia evandroi* é assinalada pela primeira vez no Estado.

Palavras chave: Phlebotominae; Psychodidae; Leishmanioses; Mato Grosso do Sul, Vetores

*Abstract: The recent occurrence of an outbreak of cutaneous leishmaniasis associated with Leishmania (Le.) amazonensis in the municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul state, Brazil, and the absence of information on its vectors in this area led the authors to undertaken captures of phlebotomines, with Shannon traps and automatic CDC light traps, in forested, animal shelter and domiciliary environments, during the period from February 2004 to January 2006. A total of 808 specimens belonging to 17 sandfly species were identified: Bichromomyia flaviscutellata, Brumptomyia avellari, Brumptomyia brumpti, Evandromyia aldafalcaoae, Evandromyia cortelezii, Evandromyia evandroi, Evandromyia lenti, Evandromyia teratodes, Evandromyia termitophila, Lutzomyia longipalpis, Nyssomyia whitmani, Pintomyia christenseni, Psathyromyia aragaoi, Psathyromyia campograndensis, Psathyromyia punctigeniculata, Psathyromyia shannoni and Sciopemyia sordellii. The presence of Lu. longipalpis, Ny. whitmani and Bi. flaviscutellata, vectors of Leishmania chagasi, Leishmania braziliensis and Le. amazonensis, respectively, is emphasized. This is the first register of Evandromyia evandroi in the State. The diversity and abundance of the species were analysed with the specimens captured with automatic CDC light traps. The diversity indexes in the forest were higher (1.2 to 1.8) than in animals shelters (0.1 a 1.4) where only two species were captured. According to the standardized Index of Species Abundance (SISA), the most common species observed in forest areas were Br. brumpti, Br. avellari e Ev. lenti, while in animals shelters were Ev. lenti e Lu. longipalpis. Regarding the night hours rhythms, the predominance of species collected (media per hour) was higher in the first three hours of observation.*

*Key-words: Phlebotominae; Psychodidae; Leishmaniasis; Mato Grosso do Sul, Vectors*

1 Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. 2 Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 3 Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ. 4 Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP. 5 Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, Campo Grande, MS.

Apoio financeiro: FUNDECT/DECIT/ Protocolo 00645-03 e UFMS.

## Introdução

As leishmanioses são atualmente consideradas importantes problemas de saúde pública nas áreas onde ocorrem, principalmente pelo franco processo de expansão e urbanização em que se encontram <sup>1</sup>.

Em Mato Grosso do Sul, a leishmaniose visceral (LV), que teve sua primeira referência no Estado através de Migone <sup>2</sup>, em 1913, encontra-se em expansão, sendo atualmente observada em nível endêmico, com notificações em 34 cidades principalmente naquelas interligadas pela BR 262 <sup>3</sup>.

A leishmaniose tegumentar (LT) que atinge 72 dos 78 municípios do Estado, ainda ocorre na vigência de ação antrópica acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino em idade produtiva e trabalhador rural <sup>4,5</sup>.

A recente identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como agente etiológico de um surto de LT em indivíduos de uma unidade de treinamento militar no município de Bela Vista <sup>6</sup> levou à investigação da fauna flebotomínea nessa área, cujo relato se constitui no objetivo da presente comunicação.

## Material e Métodos

### Área estudada

O município de Bela Vista está localizado na região sudoeste de Mato Grosso do Sul, na micro-região geográfica de Bodoquena. Apresenta uma área de 5.315 km<sup>2</sup> e coordenadas geográficas: LS: 22°06'32" e LW: 56°31'16". Seus limites são: ao Norte, com a cidade de Jardim; ao Sul, com a República do Paraguai, a Leste com o município de Antônio João e a Oeste, com Caracol. É banhada pelo rio Apa, fazendo fronteira com o distrito de Bella Vista, localizado em território paraguaio. Sua sede está a uma altitude de 180 m acima do nível do mar e dista 349 km da Capital, Campo Grande <sup>7</sup>.

De acordo com o IBGE <sup>8</sup>, da cobertura vegetal original registrada para a região, restam apenas algumas poucas formações do tipo Floresta Estacional Semidecidual. Predominam nas terras do município a vegetação do tipo formações contato savana, floresta estacional e do tipo savana (cerrado). Atualmente, 80% da

área do município estão ocupados com agricultura (lavouras temporárias) e pecuária (pastagens nativas e cultivadas).

### **Características Locais**

O 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec), localizado na cidade de Bela Vista tem uma área contemplada por uma vegetação heterogênea que compreende áreas de campo sujo, cerradão, mata ciliar e brejo, todas com um grau de antropização bastante acentuado.

Ocorrem áreas sujeitas a alagamento por estarem nas proximidades do córrego Candelão, com uma vegetação ciliar totalmente descaracterizada predominando espécies pioneiras e secundárias que se desenvolvem às margens do córrego, descaracterizando completamente o entorno do remanescente de mata. Chama a atenção a quantidade de areia e outros detritos que são carreados para dentro do córrego propiciando a formação de bancos de vegetação com espécies invasoras. Outras áreas apresentam predomínio do estrato arbóreo com espécies caducifólias que propiciam o acúmulo de matéria orgânica pela decomposição de folhas e restos vegetais depositados no solo.

Possui uma área denominada Granja onde se encontram duas residências praticamente desabitadas, uma pocilga e um galinheiro semi-abandonado. O entorno neste local é constituído por uma mata ripária seguido de uma área brejosa com vegetação herbácea e arbustiva, embora se observe a propagação e o crescimento de espécies consideradas invasoras de áreas abertas.

### **Capturas com armadilhas automáticas luminosas**

De fevereiro de 2004 a janeiro de 2006, na área utilizada para as atividades de instrução militar foram instaladas 14 armadilhas automáticas luminosas tipo CDC<sup>9</sup>, em nível de solo (1m) e copa ( $\pm$  3m). Em ambiente de mata, foram selecionados cinco pontos para as capturas, de acordo com a frequência de sua utilização e a permanência dos militares durante o período de treinamentos: Pista de corda, Pista de Primeiros Socorros, Base do Primeiro Esquadrão e Áreas de Acampamento (1 e 2).

Amostraram-se também os abrigos de animais domésticos existentes nas dependências do Regimento: um galinheiro, uma pocilga e as baias. As coletas foram quinzenais, das 18:00 às 6:00 horas, sem obedecer a horários de verão.

Durante o segundo ano de estudo, foram pesquisados também, dois domicílios, um na área central da cidade e o outro na vila militar localizada nas proximidades do Regimento.

### **Capturas com armadilha de Shannon**

Na área denominada Base do Primeiro Esquadrão foram realizadas, em ritmo mensal, capturas com armadilha de Shannon, nas cores branca e preta <sup>10</sup>, iluminadas com luz branca fria alimentada por bateria de 12 volts, com dois indivíduos capturando por um período de seis horas (início às 18:00 e término às 24:00 horas). A cada estação do ano realizou-se, também, uma captura com duração de 12 horas (das 18:00 às 6:00 horas).

Os insetos eram capturados em frascos individuais e mantidos em recipiente de barro revestido com gesso úmido até o momento do exame no laboratório do Regimento. Todas as fêmeas foram dissecadas com exposição do tubo digestivo e das espermatecas para a verificação de infecção natural e identificação específica, respectivamente. Os espécimes machos foram identificados após clarificação e montagem entre lâmina e lamínula.

A nomenclatura específica seguiu Galati <sup>11</sup> (2003).

### **Análises efetuadas**

O índice de abundância das espécies padronizado (IAEP) foi calculado segundo Roberts & Hsi <sup>12</sup> (1979).

A média geométrica de Williams <sup>13</sup> foi utilizada para quantificar a freqüência de alguns dados.

Para a estimativa da diversidade e equitabilidade das espécies, foram utilizados os Índices de Shannon (H) e de Pieloux (J) respectivamente <sup>14</sup>.

O efeito do horário sobre a distribuição de flebotomíneos foi estimado pela análise de variância, modelo completamente ao acaso. A comparação das médias obtidas foi feita pelo teste F, para  $p < 0,05$ .

Devido à inexistência de dados meteorológicos do município foram utilizados os registros climáticos da Estação Meteorológica do Aeroporto de Ponta Porã, MS (Superintendência Regional do Sudeste/Gerência de Navegação) que dista aproximadamente 100 km de Bela Vista.

## Resultados

Foram capturados 808 flebotomíneos pertencentes a oito gêneros e 17 espécies: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia aldafalcaoae*, *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia evandroi*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia teratodes*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia christenseni*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia punctigeniculata*, *Psathyromyia shannoni* e *Sciopemyia sordellii*. Em dois exemplares de *Brumptomyia* não foi possível a identificação específica.

Com as armadilhas automáticas luminosas, no total dos ambientes amostrados, foram capturados 354 flebotomíneos, dos quais 194 eram machos (54,80%) e 160 (45,20%) fêmeas, com razão de sexo machos/fêmeas para todas as espécies coletadas igual a 1,2.

O total de insetos, segundo o ambiente, nível da armadilha, o sexo e respectivos índices de diversidade e equitabilidade em cada um dos locais amostrados estão apresentados na Tabela 1. O índice de abundância das espécies padronizado (IAEP) na Tabela 2.

Considerando todos os ambientes pesquisados e o número total de flebotomíneos capturados, a espécie predominante foi *Br. brumpti* (31,36%), seguida por *Lu. longipalpis* (29,94%), *Ev. lenti* (13,28%) e *Br. avellari* (11,86%).

Os índices de diversidade em ambiente de mata foram mais altos (1,2 a 1,8) que nos abrigos de animais (0,1 a 1,4) refletindo um número mais elevado de espécies, porém, apresentando em sua maioria, baixas frequências. A menor diversidade foi observada nas baias, com apenas duas espécies capturadas.

Pelo índice de abundância das espécies padronizado (IAEP), a espécie mais abundante e presente em todos os ambientes da área estudada foi *Ev. lenti* (IAEP= 0,792) seguida *Br. brumpti* (IAEP= 0,694) e *Br. avellari* (IAEP= 0,625) que

alcançaram valores mais próximos de 1,0, o que indica abundância máxima e reflete a ocupação de maior número de ecótopos.

As espécies mais abundantes na área de mata foram *Br. brumpti* (IAEP= 1,00), *Br. avellari* (IAEP= 0,856) e *Ev. lenti* (IAEP= 0,689), com a primeira alcançando o valor que indica abundância máxima; já nos abrigos de animais, foram *Ev. lenti* (IAEP= 0,933) e *Lu. longipalpis* (IAEP= 0,867) (Tabela 2).

Nos domicílios, seis machos e sete fêmeas de *Lu. longipalpis* foram capturados na residência da vila militar, e no localizado na área central da cidade, *Ev. aldafalcaoae* (um macho e uma fêmea) e *Lu. longipalpis* (26 machos e 9 fêmeas).

Com armadilha de Shannon, além da fauna semelhante àquela obtida utilizando-se armadilhas automáticas luminosas, capturou-se *Ev. cortelezzii* e *Ev. teratodes*. Os 454 espécimes capturados com este tipo de armadilha consistiram das 13 espécies apresentadas na Tabela 3, 206 eram machos (45,37%) e 248 (54,63%) fêmeas, com razão de sexo machos/fêmeas para todas as espécies coletadas igual a 1,2. Nove exemplares fêmeas de *Brumptomyia* não apresentaram condições de identificação específica. Na armadilha de cor preta não compareceu qualquer espécime de flebotomíneo.

A média geométrica de Williams, que reflete a quantidade bem como a assiduidade com que os insetos comparecem à armadilha, foi calculada para o total de espécimes machos e fêmeas capturados mensalmente na armadilha de Shannon e encontram-se na Fig. 1. As maiores médias foram obtidas nos meses de julho, agosto e setembro, coincidindo com a estação menos chuvosa. A precipitação acumulada, a temperatura média mensal e o número total de insetos de ambos os sexos capturados nos dois anos de estudo estão apresentados na Fig. 2.

Nesse tipo de armadilha, as espécies *Ps. shannoni* (34,58%), *Ps. punctigeniculata* (21,59%) e *Ev. lenti* (14,32%) representaram 70,49% das espécies capturadas, seguidas por *Br. brumpti* (8,81%), *Bi. flaviscutellata* (5,95%), *Br. avellari* (5,95%) e *Lu. longipalpis* (4,41%). Entre as fêmeas, predominaram a de *Ps. punctigeniculata* (33,9%), seguida das de *Ps. shannoni* (17,3%).

Na Fig. 3 encontram-se as médias horárias das espécies coletadas demonstrando predomínio durante as três primeiras horas. As coletas após as 24

horas não participaram da análise e do gráfico uma vez que a partir desse horário as capturas foram muito pouco rendosas, comparecendo apenas seis exemplares: *Ps. shannoni* (três), *Br. brumpti* (dois) e *Ps. punctigeniculata* (um).

As médias horárias obtidas para *Ps. shannoni* e *Ps. punctigeniculata*, espécies mais abundantes e freqüentes, encontram-se na Fig. 4.

Excetuando-se um espécime de *Sciopemyia sordellii*, as demais fêmeas capturadas foram dissecadas e ao microscópio óptico não foram observadas formas flageladas.

## Discussão

A presença de 17 espécies de flebotomíneos na área estudada, embora com baixas freqüências, mostra uma fauna diversificada.

Excetuando-se *Ev. evandroi* que pela primeira vez é assinalada em Mato Grosso do Sul, as demais espécies já foram relatadas no Estado<sup>15, 16, 17, 18, 19, 20</sup>, ressaltando-se o estudo de Galati et al.<sup>18</sup> (2003b) em foco de LT na Serra da Bodoquena, na qual o município de Bela Vista está situado em sua parte sudoeste.

Destaca-se a não atratividade da armadilha de cor preta na área estudada, contrastando com o observado por Galati et al.<sup>10</sup> (2001) na Serra da Bodoquena, onde esta foi utilizada com maior produtividade.

Quanto ao ritmo horário noturno dos flebotomíneos da área estudada, a maior concentração de espécimes ocorreu entre 18:00 e 21:00 horas, devendo-se, portanto, reduzir o grau de exposição dos freqüentadores do local nesse período, onde pode haver maior risco de transmissão da leishmaniose.

De um modo geral, os flebotomíneos da área estudada foram capturados em todos os meses do ano, porém, as maiores densidades ocorreram durante o período mais seco, quando as temperaturas variaram de 18,2 a 25°C. Assim, o padrão de ocorrência das espécies nos dois anos de estudo parece indicar a estação mais seca como a mais favorável ao desenvolvimento da maioria das espécies.

As espécies de *Brumptomyia* estão amplamente distribuídas na América<sup>21</sup> e constituem um grupo de flebotomíneos comumente associados a tocas de tatus. Foram pouco abundantes em cavernas e áreas florestais da Serra da Bodoquena estudados por Galati et al.<sup>17, 20</sup> (2003a, 2006) e em uma gruta situada na região do

Pantanal <sup>16</sup>, porém, no presente estudo compareceram com frequência elevada (48,3%) nas armadilhas luminosas instaladas no ambiente de mata. Com a armadilha de Shannon, 15,4% delas foram capturadas, sugerindo, que diferente dos ambientes amostrados pelos pesquisadores acima, o solo da mata em questão, é favorável ao desenvolvimento desses animais e por outro lado, esses insetos são dotados de alta atratividade pela luz. Vale ressaltar que o rendimento da armadilha Shannon além de ser influenciado pela atração humana, é também, pela luz.

*Evandromyia lenti* foi a espécie mais abundante na área, estando presente nos diferentes ambientes estudados e demonstrou ser fortemente atraída pela armadilha de Shannon. Já foi observada em chiqueiro, poleiro e áreas de cerrado do Estado <sup>15</sup> sendo também uma das mais freqüentes em peridomicílios urbanos da capital, Campo Grande <sup>19</sup>, assim como em muitos municípios do Estado de Goiás onde demonstrou associação significativa com os casos de LT <sup>22</sup>.

*Lutzomyia longipalpis*, espécie de reconhecida importância na transmissão de leishmaniose visceral americana na América Latina, assim como observado por Galati et al. <sup>18</sup> (2003b) demonstrou fraca atração pela armadilha de Shannon, porém, esteve presente com 29,9% dos espécimes coletados com CDC, destacando-se que foi freqüentemente encontrada nas baias existentes nas dependências do 10º RCMec.

Tal resultado é condizente com dados de literatura que relatam a ocorrência de alta frequência deste flebotomíneo em ambiente antrópico e em abrigos de animais os quais servem como fonte de alimento <sup>23</sup>, destacando o trabalho de Ximenes et al. <sup>24</sup> (1999) que de todas as espécies coletadas sobre cavalos, 95% eram de *Lu. longipalpis*. Na Serra da Bodoquena, Galati et al. <sup>18</sup> (2003b) utilizando diferentes iscas animais, apontam o chiqueiro como importante fator de atração e ou criação deste flebotomíneo, exercendo então, o porco, atratividade significativamente maior que o cavalo e a galinha.

Ressalta-se ainda, a presença dessa espécie de flebotomíneo em domicílios da cidade, constituindo motivo de alerta para a saúde pública, haja vista a sua grande capacidade vetorial, o seu potencial de adaptação e dispersão, e a confirmação da LV na população humana <sup>3</sup> e canina no município de Bela Vista.

Além disso, a presença e a criação de animais no peridomicílio aliadas a precárias condições higiênicas pode ser um fator de agregação de *Lu. longipalpis* e também de outras espécies de flebotomíneos, aumentando o risco de transmissão de *Leishmania* <sup>24, 25</sup> .

Embora inexpressiva, merece ser assinalada a presença de *Ny. whitmani*, um dos mais importantes vetores de LT nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil e no Paraguai <sup>15, 26, 27, 28, 29, 30</sup> .

Entretanto, a identificação de *Le. braziliensis* em material de lesões cutâneas de pacientes procedentes do município de Bela Vista (Dados não publicados), permite supor que, mesmo em baixa densidade populacional, essa espécie pode oferecer risco de transmissão do parasito na área.

*Psathyromyia punctigeniculata*, já assinalada em outras áreas do Estado <sup>15, 20</sup> , praticamente não compareceu nas capturas com CDC. Todavia, apresentou a freqüência mais elevada entre as fêmeas capturadas com armadilha de Shannon, o que reforça sua importância epidemiológica em potencial, como possível vetora de agentes infecciosos ao homem. A sua presença apenas na armadilha de cor branca, contraria a observação de Galati et al. <sup>10</sup> (2001), na Serra da Bodoquena, onde esta espécie foi significativamente mais atraída pela de cor preta.

*Psathyromyia shannoni*, considerando ambos os sexos, foi a mais atraída pela armadilha de Shannon e a segunda, entre as fêmeas. Esteve presente em todos os meses do estudo, demonstrando sua importância epidemiológica como já observado por Galati et al. <sup>15</sup> (1996) em um foco de leishmaniose tegumentar no município de Corguinho, MS, onde foi a segunda espécie mais abundante nessa armadilha, sendo também freqüentemente coletada quando se empregou a de cor preta, na Serra da Bodoquena <sup>10</sup>. Foi também uma das espécies mais prevalentes nesse tipo de captura, em estudo realizado na Chapada dos Guimarães, MT <sup>31</sup>.

É uma espécie de ampla distribuição geográfica no continente Americano, e embora não esteja associada à transmissão das leishmanioses, tem sido coletada em ambientes antrópicos e em capturas com isca humana <sup>18, 27, 32</sup> , além de ser incriminada como um importante transmissor de arboviroses e de *Endotrypanum schaudinni* (Mesnil e Brimont 1908), um tripanossomatídeo exclusivo de preguiças <sup>33</sup>. Foi também encontrada parasitada por flagelados indistinguíveis de *Leishmania* <sup>34</sup>.

de origem humana através da análise de isoenzimas <sup>35</sup> e, mais recentemente, Travi et al. <sup>36</sup> (2002) demonstraram experimentalmente, através do repasto em cães infectados por *Leishmania infantum*, a infecção dessa espécie, sugerindo sua participação na veiculação do parasito.

A pouca atratividade de *Bi. flaviscutellata*, vetor comprovado da *Le. amazonensis* em outras áreas, pelo homem, tem sido relatada em outras regiões <sup>32, 37</sup>. No presente estudo, esta pouca atratividade foi indiretamente avaliada pela presença de apenas 5,95% dos espécimes capturados na armadilha de Shannon. Esse fato poderia explicar a não ocorrência usual da doença entre os freqüentadores da área. A presença dessa espécie também em outras áreas sul-mato-grossenses <sup>19, 20</sup>, a despeito do reduzido número de espécimes capturados, reveste-se de grande significado epidemiológico, pelo fato de *Le. amazonensis* já ter sido relatada como agente etiológico de casos humanos de LT ocorridos na área em estudo <sup>6</sup>. Nesse contexto, é permitido supor seu envolvimento na transmissão desse agente na localidade e possivelmente, em outras áreas de sua ocorrência no Estado de Mato Grosso do Sul, necessitando estudos complementares para a devida comprovação.

Acresce-se a isto, a demonstração da capacidade desta espécie de flebotomíneo em transmitir esse parasito a hamsters e possivelmente a outros hospedeiros <sup>38</sup>.

*Sciopemyia sordellii*, também já foi relatada em outros estudos no Mato Grosso do Sul <sup>15, 16</sup>, e provavelmente se alimenta de animais de sangue frio. No presente estudo foi encontrada infectada por grande quantidade de flagelados, ainda sem a identificação específica.

Amplia-se, portanto, o conhecimento a respeito da fauna flebotomínea em Mato Grosso do Sul, e considerando a presença de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata*, espécies potenciais para a transmissão de leishmanioses, aliado ao fato de que o município faz fronteira com o Paraguai, e o trânsito de pessoas e animais é ato contínuo, impõem-se um alerta à vigilância sanitária a fim de manter o constante controle na região com vistas a minimizar o avanço dessas doenças no Estado e para o país vizinho.

### **Agradecimentos**

Ao comando e aos militares do 10º RCMec pelo incondicional apoio à pesquisa e aos membros da equipe. À Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde, nas pessoas do Sr. Elias Monteiro pelo apoio logístico e do Sr. João Anastácio, pela colaboração nos trabalhos de campo. Aos militares André Flávio Maria Zimmermann e Claudemar Borges Dias pela receptividade de sempre e incansável colaboração nas capturas.

---

## Referências

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-318.
2. Migone LE. Um caso de kala-azar à Assuncion (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot* 1913; 6:118-120.
3. Mato Grosso do Sul. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. Relatório de notificações de Leishmanioses. 2006. Campo Grande.
4. 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: 185-193.
5. Nunes VLB. Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998, 1999. São Paulo, [Tese de Doutorado em Saúde Pública-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo], 2001.
6. Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo ANC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(1): 43-46.
7. Bela Vista. Mato Grosso do Sul. Secretaria Municipal de Saúde. Plano Municipal de Saúde de Bela Vista, 1997 a 2001; Bela Vista; 2001.
8. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Extrativa Vegetal. Rio de Janeiro; 2002.
9. Natal D, Marucci D, Reis IM, Galati EAB. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). *Rev Bras Entomol* 1991; 35(4): 697-700.
10. 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(5): 641-647.
11. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. (Organizadores). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
12. Roberts DR, Hsi BP. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environ Entomol* 1979; 8(6): 1007-1013.
13. Haddow AJ. Studies on the biting-habits and medical importance of East African mosquitos in the genus *Aedes*. I. Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. *Bull Entomol Res* 1960; 50: 759-779.
14. Hayeck LAC, Buzas MA. *Surveying Natural Populations*. New York: Columbia University Press; 1997. p. 347-389.

15. 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 Saú Pú 1996; 30: 115-128.
16. Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saú Pú 1997; 31(4):378-90.
17. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, 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;7(2): 283-296.
18. Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Patol Trop 2003b; 32(2): 235-261.
19. Oliveira AG, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 1999-2000. Cad Saú Pú 2003; 19: 933-944.
20. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Damasceno-Júnior GA. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(2): 175-193.
21. Martins AV, Falcão AL, Williams P. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1978. 195p.
22. Martins F, Silva IG, Bezerra WA, Maciel JM, Silva HHG, Lima CG, Cantuária PB, Ramos OS, Ribeiro JB, Santos AS. Diversidade e freqüência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. Rev Patol Trop 2002; 31: 211-224.
23. Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG, Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 305-322.
24. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 427-432.
25. Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peri-domiciliares, no Estado de São Paulo. Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo 1953; 7: 158-167.
26. Rangel EF, Lainson R, Souza AA. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) a vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Is it a complex of cryptical species? Mem Inst Oswaldo

- Cruz 1990; 85(suppl I): 122.
27. Hashiguchi Y, Chiller T, Inchausti A, Arias A, Kawabata M, Alexander JB. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *An Trop Med Parasitol* 1992; 86: 175-180.
  28. Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa AF, Sousa RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 693-698.
  29. Dias-Lima AG, Guedes MLS, Sherlock IA. Horizontal stratification of sandfly (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain Forest, state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 733-737.
  30. Leonardo FS, Rebêlo JMM. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 282-284.
  31. Biancardi CMAB, Castellón EG. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado do Mato Grosso, município de Chapada dos Guimarães, Brasil. *Acta Amazônica* 2000; 30: 115-118.
  32. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes CB. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic Forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *An Trop Med Parasitol* 2005; 99(7): 683-693.
  33. Comer JA, Tesh RB, Modi GB, Corn JL, Nettles VF. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 483- 490.
  34. Franco AMR, Grimaldi G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 261-268.
  35. Rowton E, Mata M, Rizzo N, Navin T, Porter C. Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parassitologia* 1991; 33(Suppl. 1): 501-504.
  36. Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci* 2002; 72(1): 83-86.
  37. Lainson R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; 18: 47-56.
  38. Scherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 97: 671-683.

Tabela 1- Flebotomíneos de ambos os sexos, capturados quinzenalmente com armadilhas automáticas luminosas em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006 e respectivos índices de diversidade (H) e eqüitabilidade(J).

Espécie	Local	Pista de corda		Pista de 1 <sup>os</sup> Socorros				Base do 1 <sup>o</sup> Esquadrão				Acampamento 1		Acampamento 2		Galinheiro		Chiqueiro		Baías				Total							
		Nível		Solo		Copa		Solo		Copa		Solo		Copa		Solo		Solo		Solo		Copa		336							
		Nº de capturas		24		24		24		24		24		24		24		24		24		24									
		Sexo		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F				
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>		-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4				
<i>Brumptomyia avellari</i>		1	-	3	4	3	3	1	1	3	1	3	3	2	-	3	2	3	-	3	2	1	-	-	-	-	26	16			
<i>Brumptomyia brumpti</i>		3	7	6	6	3	7	4	5	2	5	8	7	4	4	14	9	5	2	6	3	-	-	1	-	-	-	56	55		
<i>Brumptomyia sp</i>		-	-	-	2	-	-	-	2	-	2	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9			
<i>Evandromyia evandroi</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
<i>Evandromyia lenti</i>		1	-	2	1	1	-	1	2	1	4	3	2	1	2	5	2	-	-	-	1	1	3	6	6	-	2	-	22	25	
<i>Evandromyia termitophila</i>		-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2			
<i>Lutzomyia longipalpis</i>		-	1	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	3	1	28	10	37	20	72	34	
<i>Nyssomyia whitmani</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
<i>Pintomyia christenseni</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
<i>Psathyromyia aragai</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
<i>Psathyromyia campograndensis</i>		-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	4		
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>		-	-	4	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4		
<i>Psathyromyia shannoni</i>		-	-	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	3	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	10	1		
<i>Sciopemyia sordellii</i>		-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2		
TOTAL		5	8	17	15	8	14	8	12	8	15	15	15	10	7	23	14	8	10	9	7	4	4	14	7	28	12	37	20	194	160
H		1,50		1,80				1,70				1,20		1,40		1,40		1,40		0,10				1,79							
J		0,80		0,80				0,70				0,70		0,60		1,30		0,80		0,10				0,66							

Tabela 2- Índice de Abundância das Espécies Padronizado (IAEP) dos flebotomíneos capturados com armadilha automática luminosa em área de mata e em abrigos de animais domésticos no 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006.

Espécies	Mata		Abrigo de animais		Total	
	IAEP	Posição	IAEP	Posição	IAEP	Posição
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	0,189	8 <sup>a</sup>	-	-	0,118	10 <sup>a</sup>
<i>Brumptomyia avellari</i>	0,856	2 <sup>a</sup>	0,200	3 <sup>a</sup>	0,625	3 <sup>a</sup>
<i>Brumptomyia brumpti</i>	1,000	1 <sup>a</sup>	0,067	5 <sup>a</sup>	0,694	2 <sup>a</sup>
<i>Brumptomyia</i> sp	0,378	4 <sup>a</sup>	-	-	0,243	7 <sup>a</sup>
<i>Evandromyia evandroi</i>	0,056	11 <sup>a</sup>	-	-	0,035	12 <sup>a</sup>
<i>Evandromyia lenti</i>	0,689	3 <sup>a</sup>	0,933	1 <sup>a</sup>	0,792	1 <sup>a</sup>
<i>Evandromyia termitophila</i>	0,111	9 <sup>a</sup>	-	-	0,069	11 <sup>a</sup>
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0,233	7 <sup>a</sup>	0,867	2 <sup>a</sup>	0,500	4 <sup>a</sup>
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0,044	12 <sup>a</sup>	-	-	0,028	13 <sup>a</sup>
<i>Pintomyia christenseni</i>	0,056	11 <sup>a</sup>	-	-	0,035	12 <sup>a</sup>
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0,056	11 <sup>a</sup>	-	-	0,035	12 <sup>a</sup>
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0,322	6 <sup>a</sup>	0,167	4 <sup>a</sup>	0,292	6 <sup>a</sup>
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	0,322	6 <sup>a</sup>	-	-	0,201	8 <sup>a</sup>
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0,333	5 <sup>a</sup>	0,167	4 <sup>a</sup>	0,306	5 <sup>a</sup>
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0,078	10 <sup>a</sup>	0,167	4 <sup>a</sup>	0,139	9 <sup>a</sup>

Tabela 3- Número de flebotomíneos segundo o sexo, capturados mensalmente com armadilha de Shannon em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006.

Espécies	Meses		Fev.		Mar.		Abr.		Mai.		Jun.		Jul.		Ago.		Set.		Out.		Nov.		Dez.		Jan.		Total		Total Geral		
	Sexo		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	n	%	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>			-	-	2	-	-	-	-	-	4	4	14	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	19	27	5,95
<i>Brumptomyia avellari</i>			-	-	-	-	-	-	1	-	9	2	1	1	5	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	10	27	5,95	
<i>Brumptomyia brumpti</i>			-	-	3	4	1	3	-	1	4	6	1	2	4	4	1	2	2	1	1	-	-	-	-	-	17	23	40	8,81	
<i>Brumptomyia sp</i>			-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0,66	
<i>Evandromyia cortelezii</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0,66	
<i>Evandromyia lenti</i>			-	2	-	-	-	1	-	4	11	6	4	8	3	5	6	10	1	1	-	-	-	3	-	-	25	40	65	14,32	
<i>Evandromyia teratodes</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	0,22		
<i>Evandromyia termitophila</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,22		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	1	1	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	11	20	4,41	
<i>Nyssomyia whitmani</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	4	0,88	
<i>Psathyromyia campograndensis</i>			-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,22	
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>			4	11	2	6	1	3	-	7	5	12	2	11	-	6	-	7	-	7	-	4	-	9	-	1	14	84	98	21,59	
<i>Psathyromyia shannoni</i>			4	3	-	1	9	4	-	3	8	6	23	8	35	8	15	3	5	2	9	1	5	1	1	3	114	43	157	34,58	
<i>Sciopemyia sordellii</i>			-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	-	7	7	1,54	
Total			8	16	7	11	11	12	1	16	37	40	39	50	48	34	31	31	8	12	10	5	5	14	1	7	206	248	454	100,00	

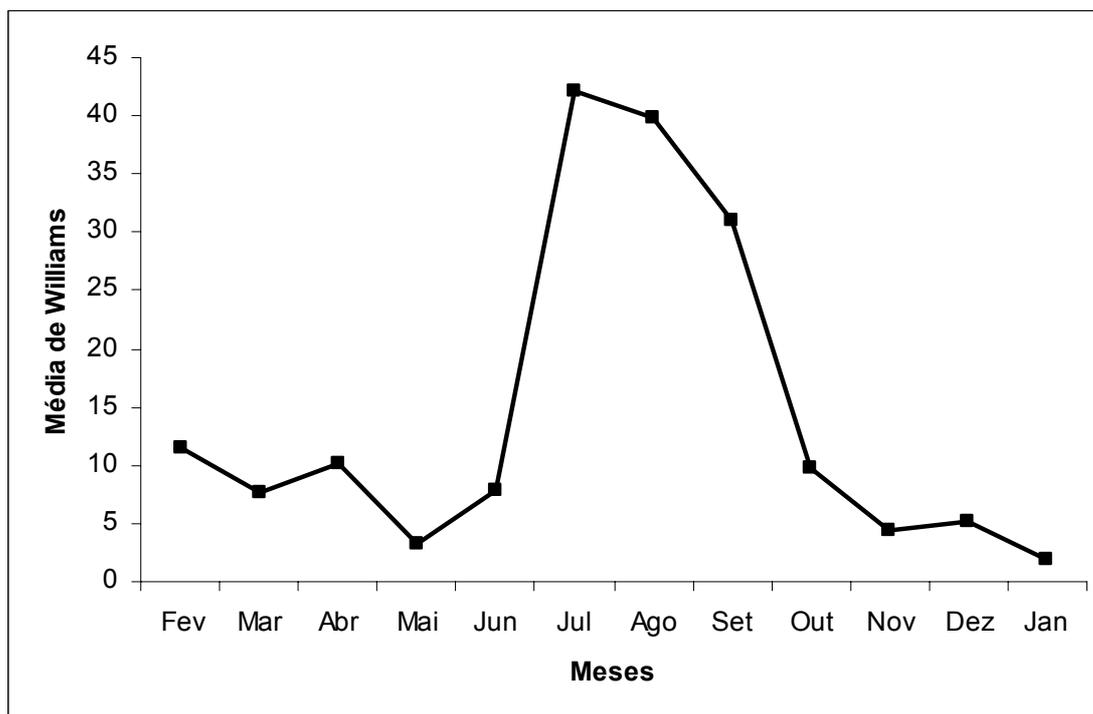


Figura 1- Média mensal de Williams para ambos os sexos das espécies de flebotomíneos capturadas com armadilha de Shannon em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006.

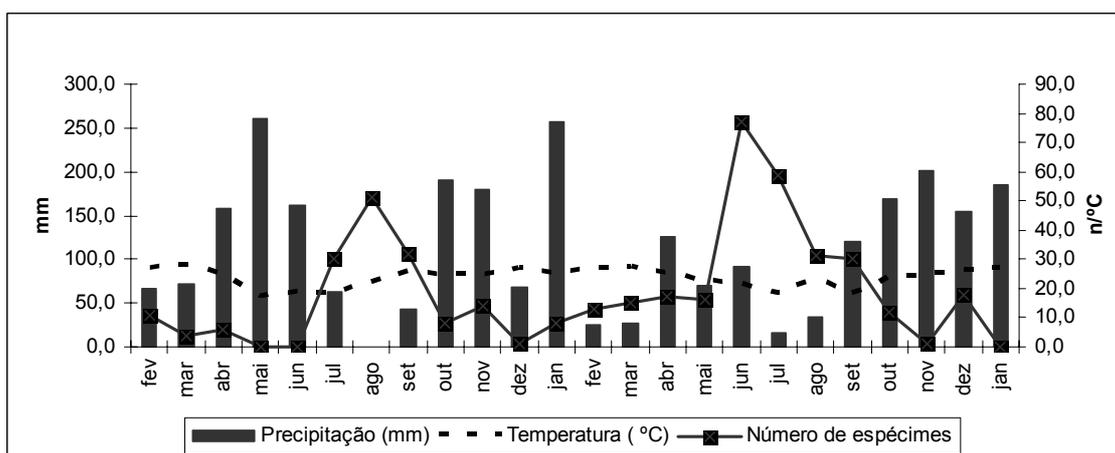


Figura 2- Precipitação, temperatura média mensal e número de flebotomíneos de ambos os sexos capturados mensalmente com armadilha de Shannon em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006.

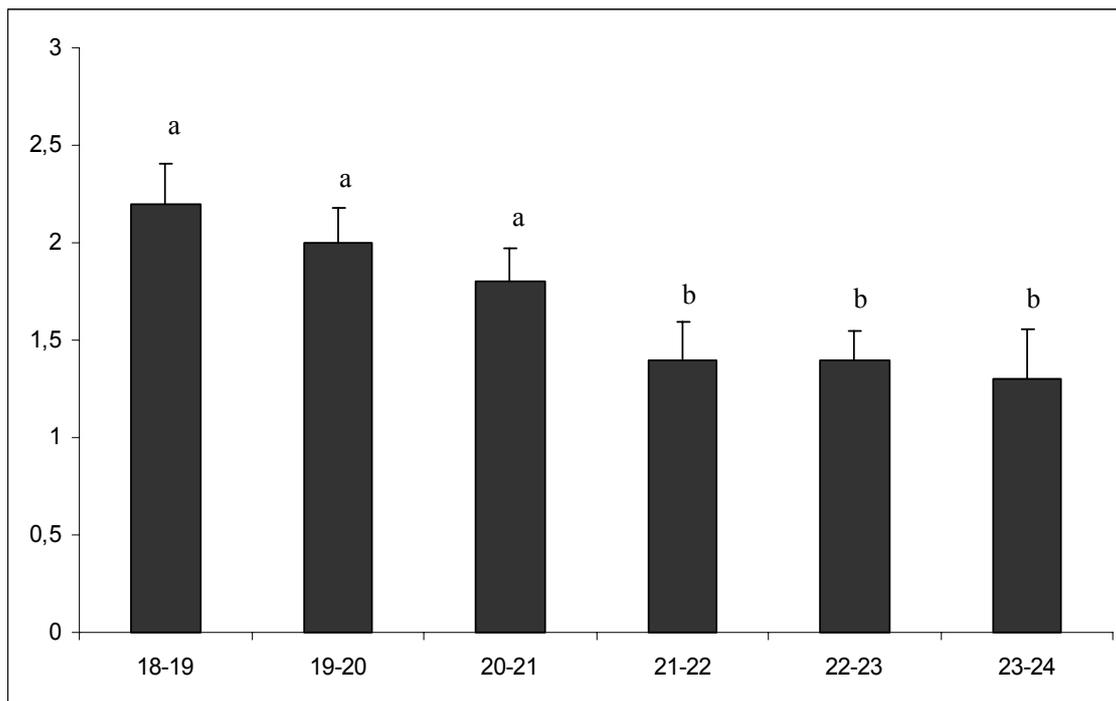


Figura 3- Média de Williams e erro padrão para ambos os sexos das espécies de flebotomíneos capturados mensalmente com armadilha de Shannon em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006. Letras diferentes entre colunas, representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

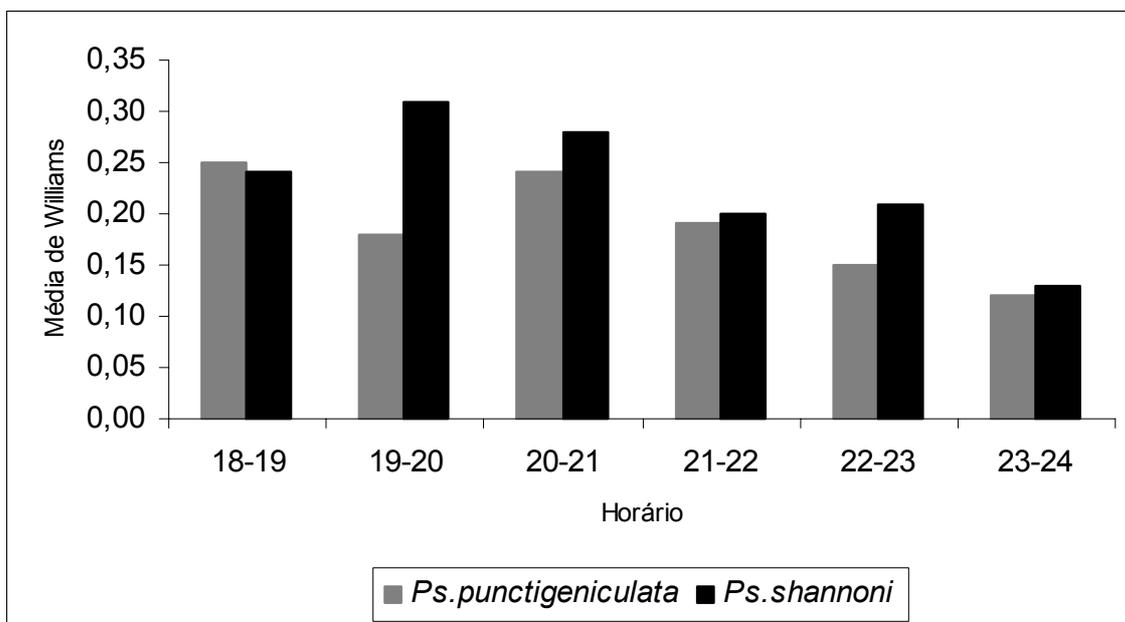


Figura 4- Média de Williams horária para ambos os sexos das espécies mais abundantes capturadas mensalmente com armadilha de Shannon em área do 10º RCMec, município de Bela Vista, MS, fevereiro de 2004 a janeiro de 2006.

## ARTIGO 3

**Capturas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com armadilha de Disney em área de ocorrência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

**A ser submetido à publicação**

**Capturas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com armadilha de Disney em área de ocorrência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

*Captures of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) with Disney trap in area with occurrence of Leishmania (Leishmania) amazonensis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil*

Maria Elizabeth C. Dorval<sup>1</sup>, Elisa Teruya Oshiro<sup>1</sup>, Geucira Cristaldo<sup>1</sup>, Hilda Carlos da Rocha<sup>1</sup>, Tulia Peixoto Alves<sup>2</sup>, Murilo Andrade Alves<sup>2</sup>, Alessandra Gutierrez de Oliveira<sup>1</sup>, Reginaldo Peçanha Brazil<sup>3</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>

Resumo: Com o objetivo de se conhecer a fauna flebotomínea e aspectos da transmissão da leishmaniose tegumentar em área de ocorrência de *Leishmania amazonensis*, foram realizadas capturas de flebotomíneos utilizando-se armadilhas tipo Disney modificadas, com isca roedor, *Mesocricetus auratus*, no período de maio de 2004 a abril de 2006, no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul. As coletas resultaram na identificação de 10 espécies de Phlebotominae: *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia brumpti*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Evandromyia bourrouli*, *Evandromyia lenti*, *Lutzomyia longipalpis*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia punctigeniculata*, *Psathyromyia shannoni* e *Sciopemyia sordellii*. As duas espécies predominantes foram *Ev. bourrouli* com 57,26% dos espécimes coletados e *Bi. flaviscutellata* representada por 41,4%, que esteve presente em todos os locais amostrados. Dois hamsters sentinelas adquiriram a infecção natural. O parasito isolado foi identificado como *Leishmania amazonensis*.

Palavras chave: Phlebotominae; *Bichromomyia flaviscutellata*; Isca animal; Infecção natural; *Leishmania amazonensis*, Mato Grosso do Sul

*Abstract: Investigation was undertaken to study the phlebotomine fauna and aspects of the cutaneous leishmaniasis transmission in a forested area with the occurrence of Leishmania (Leishmania) amazonensis situated in the municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul state, Brazil The captures were carried out with modified Disney traps, having hamster (Mesocricetus auratus) as bait, during the period from May 2004 to January 2006. Ten species of phlebotomine were captured: Brumptomyia avellari, Brumptomyia brumpti, Bichromomyia flaviscutellata, Evandromyia bourrouli, Evandromyia lenti, Lutzomyia longipalpis, Psathyromyia campograndensis, Psathyromyia punctigeniculata, Psathyromyia shannoni and Sciopemyia sordellii. Although Ev. bourrouli was the most frequent (57,26%), Bi. flaviscutellata (41,4%) was captured in a widest distribution; predominated in dry period*

(July – September), but presented a peak on March. Two of 36 hamsters used as bait presented natural infection by *Leishmania*. The parasite was identified as *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

*Key-words: Phlebotominae; Bichromomyia flaviscutellata; Animal bait; Natural infection; Leishmania amazonensis; Mato Grosso do Sul state*

1 Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. 2 Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 3 Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ. 4 Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP. 5 Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, Campo Grande, MS.

Apoio Financeiro: FUNDECT/DECIT/Protocolo 00645-03 e UFMS.

## Introdução

As leishmanioses são agravos considerados importantes problemas de saúde pública no Estado de Mato Grosso do Sul, principalmente, pelo processo de expansão geográfica e incremento no número de casos <sup>1</sup>.

Nos últimos dez anos, a fauna flebotomínea do Mato Grosso do Sul vem sendo ecologicamente estudada, demonstrando riqueza variada de espécies, em diferentes ecótopos. Esses estudos têm apontado para novas espécies ou reforçam o papel que algumas desempenham na transmissão das leishmanioses para a população de diferentes municípios, contribuindo para o conhecimento da epidemiologia dessas doenças no Estado <sup>2, 3, 4, 5, 6, 7</sup>.

A identificação dos flebotomíneos, seus hábitos, seus índices de infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*, e o conhecimento das relações entre estas e seus hospedeiros vertebrados e invertebrados são fundamentais para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses, auxiliando nas medidas de prevenção e controle em suas áreas de ocorrência <sup>8, 9</sup>.

Relatos da presença de *Bichromomyia flaviscutellata* em Mato Grosso do Sul são relativamente recentes <sup>5, 7</sup>, assim como a constatação de casos humanos e animais de leishmaniose tegumentar associados à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* <sup>10, 11</sup>. Para melhor compreender a epidemiologia da leishmaniose na cidade de Bela Vista, MS, área de origem dos casos humanos atribuídos a esse agente etiológico, estão sendo desenvolvidos estudos sobre aspectos relacionados ao comportamento da fauna flebotomínea. O presente trabalho tem como objetivo descrever e analisar a fauna flebotomínea capturada em armadilha de Disney modificada, tendo como isca hamsters, reconhecidamente atrativos para vetores de *Le. amazonensis*.

## Material e Métodos

O município de Bela Vista está situado na região sudoeste de Mato Grosso do Sul, na micro-região geográfica de Bodoquena. Seus limites são: ao Norte, com a cidade de Jardim; ao Sul, com a República do Paraguai, a Leste com o município de Antônio João e a Oeste, com Caracol. É banhada pelo rio Apa, fazendo fronteira

com o distrito de Bella Vista, localizado em território paraguaio. Sua sede está a uma altitude de 180 m acima do nível do mar e dista 349 km da capital, Campo Grande <sup>12</sup>.

De acordo com o IBGE <sup>13</sup> (2002), da cobertura vegetal original registrada para a região, restam apenas algumas poucas formações do tipo Floresta Estacional Semidecidual. A vegetação predominante é do tipo formações contato savana, floresta estacional e do tipo savana (cerrado).

O estudo foi realizado em uma área de reserva do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec), localizado na zona urbana desta cidade, e utilizada sistematicamente para as atividades de instrução militar.

### **Captura de flebotomíneos**

A atração por isca animal foi realizada utilizando-se seis armadilhas Disney <sup>14</sup> modificadas (Fig. 1), associadas com isca roedor, hamster (*Mesocricetus auratus*). Os animais ficavam individualmente alojados em gaiolas de plástico de acordo com as recomendações de densidade populacional (Institute of Laboratory Animal Resources) <sup>15</sup>, com cama de maravalha de *Pinnus* sp e recebiam água e ração comercial Nuvilab CR-1® (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) à vontade. Semanalmente, as gaiolas eram limpas e a alimentação complementada.

Foram utilizados 36 animais de ambos os sexos, provenientes do Biotério de experimentação do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

As armadilhas foram instaladas no interior das matas, a cerca de 20 cm do solo, com troca do animal sentinela a cada três meses ou quando da observação do comprometimento do estado geral do animal (emagrecimento, alteração na pelagem, lesões de pele). Uma vez por semana, os animais eram observados por um militar treinado pela equipe, em busca de possíveis lesões. Quando o hamster era retirado da armadilha, permanecia no biotério de experimentação do Laboratório de Parasitologia da UFMS por um período de oito meses para a investigação da infecção natural por *Leishmania*.

As capturas tiveram início em maio de 2004 e estenderam-se até o mês de abril de 2006.

Os insetos atraídos ao animal ficavam aderidos às placas previamente

untadas com óleo de rícino e, a cada semana, eram coletados com o auxílio de um pincel de ponta fina e macia, acondicionados em frascos contendo isopropanol e mantidos em temperatura de geladeira até o momento da identificação. As fêmeas foram identificadas através da exposição e reconhecimento morfológico das espermatecas, e os machos, após clarificação, no Laboratório de Parasitologia da UFMS. A identificação e nomenclatura específicas seguiram Galati<sup>16</sup> (2003).

A média geométrica de Williams<sup>17</sup> foi utilizada para quantificar a frequência de alguns dados.

Devido à inexistência de dados meteorológicos do município foram utilizados os registros climáticos da Estação Meteorológica do Aeroporto de Ponta Porã, MS (Superintendência Regional do Sudeste/Gerência de Navegação) que dista aproximadamente 100 km de Bela Vista.

## Resultados

Um total de 1.191 flebotomíneos (622 machos e 529 fêmeas) pertencentes a 10 espécies foram coletados: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia bourrouli*, *Evandromyia lenti*, *Lutzomyia longipalpis*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia punctigeniculata*, *Psathyromyia shannoni* e *Sciopemyia sordellii*.

O número total de espécimes capturados nos diferentes sítios, encontra-se na Tabela 1. A razão de sexo machos/fêmeas para todas as espécies coletadas foi igual a 1,2:1,0, influenciada pelo grande número de machos de *Ev. bourrouli* capturados. Para *Bi. flaviscutellata* essa razão foi de 1,0:16,6, indicando a maior atração de fêmeas às armadilhas.

As duas espécies predominantes foram *Ev. bourrouli* com 57,26% dos espécimes coletados e *Bi. flaviscutellata* representada por 41,4%, que esteve presente em todos os locais amostrados. As demais espécies compareceram esporadicamente às armadilhas, atingindo todas elas 1,34% do total de exemplares capturados.

Dentre todos os sítios de captura, a Pista de Sobrevivência e a Pista de Primeiros Socorros foram os locais que apresentaram maior densidade de espécimes, 70,11% e 16,46%, respectivamente.

Destaca-se a alta densidade de *Ev. bourrouli*, espécie capturada apenas na Pista de Sobrevivência, e que apresentou uma explosão nos meses de novembro e dezembro de 2005, com 99,85% (681) dos espécimes coletados nesse período.

Cabe relatar que no primeiro ano do estudo, devido a intercorrências como mudanças freqüentes dos pontos de captura pelo furto das armadilhas, as observações foram bastante prejudicadas. Assim sendo, para a construção dos gráficos e análise de distribuição sazonal, foram utilizados somente os espécimes de *Bi. flaviscutellata* capturados entre maio de 2005 e abril de 2006.

Na Fig. 2, em que se plotam a precipitação mensal e as temperaturas médias mensais, bem como o desempenho de *Bi. flaviscutellata*, evidencia-se que embora a espécie tenha sido capturada praticamente o ano todo, com brusca redução a partir de outubro, observam-se picos de alta densidade associados às épocas mais secas do período considerado.

A distribuição sazonal das fêmeas de *Bi. flaviscutellata* obtida pela média geométrica de Williams está representada na Fig. 3, na qual se pode observar os valores mais elevados no inverno, quando, capturou-se pelo menos 3,5 vezes mais do que nas demais estações.

Dos 36 hamsters sentinelas que cumpriram todo o período de exposição na área estudada, dois apresentaram lesões sugestivas de LT. O parasito isolado foi caracterizado como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os animais haviam sido colocados nas armadilhas da Pista de Sobrevivência no mês de março de 2006, e retirados no início do mês de maio, quando do término dos trabalhos de campo.

## **Discussão**

Na dependência de aspectos inerentes ao comportamento dos flebotomíneos, tais como, atração pela luz, hábito alimentar e tropismos apresentados pelos mesmos, os métodos de captura destes insetos oferecem estimativas diversas sobre a abundância relativa das diferentes espécies<sup>18</sup>.

Os resultados obtidos com as armadilhas de Disney complementam as informações a respeito da fauna flebotomínea na área em estudo, realizadas por meio de capturas com armadilhas automáticas luminosas e de Shannon, através das

quais foram capturados, respectivamente, 354 e 454 espécimes, pertencentes a 18 espécies de flebotomíneos (Dados a serem publicados).

A eficiência da armadilha tipo Disney para *Bichromomyia flaviscutellata* ficou evidente, tendo em vista que esta espécie foi a segunda mais abundante, quando considerados ambos os sexos, e primeira em relação às fêmeas. Com os outros dois métodos utilizados, a espécie esteve presente em baixas densidades, armadilha automática luminosa (1,13%) e armadilha de Shannon (5,95%), constatando-se, portanto, o baixo grau de atratividade exercida pela luz e pelo homem para *Bi. flaviscutellata*. Essa espécie é reconhecidamente o principal vetor de *Le. amazonensis*<sup>19, 20, 21</sup>, e embora relatada como predominante de fauna flebotomínea antropofílica em áreas de cobertura vegetal não climática na Amazônia<sup>22</sup>, ainda é considerada uma espécie pouco atraída pelo homem, e de hábitos noturnos<sup>23, 24, 25, 26, 27</sup>. É considerada estritamente silvestre, particularmente encontrada em florestas úmidas, especialmente aquelas temporariamente inundáveis<sup>24</sup>, porém, vem demonstrando ser resistente às mudanças ecológicas, revelando grande adaptabilidade a diferentes tipos de vegetação<sup>22, 28</sup>, sendo inclusive encontrada em ambientes antrópicos<sup>5, 28, 29</sup>, o que pode contribuir para ampliar sua área de distribuição no país.

No tipo de armadilha utilizada, onde não há interferência humana e nem luminosa, a captura de grande número de espécimes fêmeas reflete o maior poder de atração da isca animal, corroborando as afirmativas sobre a preferência alimentar desta espécie por roedores<sup>19, 22, 23</sup>.

Ainda que espécies de roedores silvestres, reservatórios comprovados de *Le. amazonensis*, não tenham sido utilizadas como iscas, e necessite investigações a respeito delas na área de estudo, a presença simultânea do vetor e da espécie de *Leishmania* por ele transmitida<sup>11</sup>, pode ser considerada um fator preditivo de ocorrência de surtos de leishmanioses, quando da permanência noturna de contingente militar.

Embora um número maior de espécimes tenha sido capturado na Pista de Primeiros Socorros e na Pista de Sobrevivência, *Bi. flaviscutellata* esteve presente em todas as armadilhas, indicando estar distribuída em toda a área de instrução, ou que se dispersa ativamente à procura de alimento. A presença de grande

quantidade de material orgânico depositado no solo da mata, tais como, folhas e restos de vegetais em decomposição, fezes de eqüinos e restos de alimentos, assim como em uma clareira cujo entorno apresenta vegetação densa com predomínio do estrato arbóreo com espécies caducifólias podem estar favorecendo a ocorrência de criadouros. Por outro lado, a presença dos resíduos antrópicos pode estar propiciando a populações de roedores, que como visto são atrativos para *Bi. flaviscutellata*.

Shaw e Lainson <sup>24</sup> (1972) ao estudarem a variação sazonal de *Bi. flaviscutellata* em áreas florestais observaram que durante a época mais seca, de junho a novembro, a população desses insetos aumentava, atingindo o pico em dezembro. Na área estudada, a ocorrência da média geométrica de Williams durante o inverno, 3,5 vezes maior em relação à das demais estações, também indica associação da freqüência mais elevada da espécie com o período mais seco. O pico isolado observado ao final do verão pode ser reflexo da permanência de uma maior quantidade de indivíduos de *Bi. flaviscutellata* em estágio larval por período mais longo, quando o solo ainda se encontra com excesso de umidade.

A utilização da área em questão para instruções militares dá-se de março a maio, quando ocorre uma maior oferta de alimento aos roedores, atraídos por resíduos antrópicos, podendo levar a uma maior circulação da *Le. amazonensis*. Acresce-se a isto o pico de *Bi. flaviscutellata*, o que possivelmente explique a infecção natural pela *Le. amazonensis* no hamster sentinela em março.

Assim, ao se constatar maior regularidade dos espécimes de *Bi. flaviscutellata* durante o período mais seco (julho-setembro) pode-se supor que o risco de transmissão da LT também esteja aumentado se houver exposição da população humana na área.

No entanto, períodos cujas médias não são tão elevadas, como ocorreu no final do verão, também podem oferecer risco de transmissão do parasito, pois na dependência de fatores climáticos e endógenos da espécie *Bi. flaviscutellata*, ela pode apresentar aumento abrupto de densidade, ou seja, comportamento explosivo. E, se houver coincidência de sua explosão com a exposição de militares para as instruções, como ocorrido durante o período de estudo, surtos podem ocorrer, tal como se suspeitou do provável período de infecção relatado para casos humanos

ocorridos na área <sup>11</sup>. A constatação da infecção natural do animal sentinela exposto durante a explosão desta espécie (março) reforça este ponto de vista.

À luz das observações, sugere-se que a permanência na área de mata para exercícios militares ocorra de novembro a fevereiro, quando a densidade de *Bi. flaviscutellata* encontra-se em densidades reduzidas.

*Evandromyia bourrouli*, espécie cujo hábitat inclui florestas e tocas de tatus <sup>30</sup>, foi capturada em alta densidade por este método de captura, e a presença de praticamente todas as fêmeas ingurgitadas parece determinar o seu hábito rodentofílico. Em capturas que utilizam armadilhas luminosas, o rendimento é sempre inferior, com os espécimes coletados em áreas de matas e ambientes antrópicos, principalmente nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste <sup>5, 28, 31</sup>.

Na comparação de machos e fêmeas capturados na armadilha de Disney, a coleta de um número bastante reduzido de fêmeas de *Ev. bourrouli* (14,7%), comparada a de *Bi. flaviscutellata* (94,3%), além de mostrar uma maior preferência desta última para se alimentar em roedores, parece apontar para comportamentos distintos dos respectivos machos. O maior número de machos de *Ev. bourrouli* pode ser atribuído a fatores já relatados para outras espécies de flebotomíneos, tais como, a instalação das armadilhas próxima a locais de criadouros e abrigo desses insetos, a atração dos machos para a cópula durante o repasto e ainda, que os machos ao liberarem feromônios tenham atraído mais espécimes do mesmo sexo <sup>32, 33, 34, 35, 36</sup>. Deve-se considerar também, a possibilidade de machos de *Ev. bourrouli* serem mais atraídos por cairomônios liberados por vertebrados, e o fato de que características como estas, estejam ausentes ou menos pronunciadas em *Bi. flaviscutellata*.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que, assim como em outras áreas de ocorrência de LT em Mato Grosso do Sul <sup>2, 37, 38</sup>, a transmissão da doença está associada ao padrão silvestre, com a exposição do homem aos vetores em seu habitat natural.

Assim, embora reconhecendo a importância das atividades militares, principalmente no que diz respeito à defesa de nossas fronteiras, impõem-se a necessidade do planejamento das atividades para épocas de menor densidade do vetor e a instituição de medidas de proteção individual, na tentativa de reduzir o contato com o vetor e o risco de aquisição do parasito.

### **Agradecimentos**

Ao comando e aos militares do 10º RCMec pelo incondicional apoio à pesquisa e aos membros da equipe. À Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde, nas pessoas do Sr. Elias Monteiro pelo apoio logístico e do Sr. João Anastácio, pela colaboração nos trabalhos de campo. Aos militares André Flávio Maria Zimmermann e Claudemar Borges Dias pela receptividade de sempre e incansável colaboração nas capturas.

## Referências

1. Mato Grosso do Sul. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. Relatório de notificações de Leishmanioses. 2006.
2. 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 Saú Púb 1996; 30: 115-128.
3. Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saú Púb 1997; 31(4): 378-90.
4. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, 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;7(2): 283-296.
5. Oliveira AG, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 1999-2000. Cad Saú Púb 2003; 19: 933-944.
6. Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Patol Trop 2003b; 32(2): 235-261.
7. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Damasceno-Júnior GA. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(2): 175-193.
8. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi GJr. Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93: 663-668.
9. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias Edelberto S. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2002; 44 (5): 255-259.
10. Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Parasitol 2005; 128:41-45.
11. Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo ANC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 43-46.

12. Bela Vista. Mato Grosso do Sul. Secretaria Municipal de Saúde. Plano Municipal de Saúde de Bela Vista 1997 a 2001. Bela Vista; 2001.
13. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Extrativa Vegetal. Rio de Janeiro; 2002.
14. Disney RHL. A trap for phlebotomine sand flies attracted to rats. Bull Entomol Res 1966; 56: 445- 451.
15. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. National Academic Press; 1996.
16. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. (eds). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-5.
17. Haddow AJ. Studies on the biting-habits and medical importance of East African mosquitos in the genus *Aedes*. I. Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. Bull Entomol Res 1960; 50: 759-779.
18. Killick-Kendrick R. Methods for the study of phlebotomine sand-flies. Appendix II. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. W. Peters & Killick-Kendrick (eds). London: Academic Press; 1987. p. 473-497.
19. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62: 385-395.
20. Ward R, Lainson R, Shaw JJ. Further evidence of the role of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. Trans R Soc Med Hyg 1973; 67: 608-609.
21. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox, JP Kreir, D Wakelin (eds). Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Topley & Wilson's, Arnold, Sydney, Auckland; 2005. p. 313-349.
22. Ready PD, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of “enzootic rodent leishmaniasis” (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of “pian –bois” (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forest in eastern Amazônia. Trans R Soc Med Hyg 1983; 77(5): 775-785.
23. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. II. Observations on enzootic leishmaniasis in the lower Amazon region – the feeding habits of the vector *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62: 396-405.
24. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). Trans R Soc Trop Med Hyg 1972; 66: 709-717.
25. Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa A, Suza AA. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis* aetiological agents of cutaneous

- leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75(4): 524-529.
26. Ryan L, Lainson R, Shaw JJ, Neto HF. Ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na região Amazônica. Instituto Evandro Chagas. Belém; 1986. p. 307-315.
  27. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes CB. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic Forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *An Trop Med Parasitol* 2005; 99(7): 683-693.
  28. Rebêlo JMM, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saú Púb* 1999; 15(3): 623-630.
  29. Feitosa MAC, Castellón EG. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazônica* 2004; 34(1): 121-127.
  30. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R. (eds). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 207-255.
  31. Andrade-Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL. Flebotomíneos do Estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(4): 323-329.
  32. Taniguchi HH, Tolezano JE, Corrêa FMA, Moraes RHP, Veiga RMO, Marassá AM. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. I- Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, Região de Sorocaba. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1991; 51 (1/2): 23-30.
  33. Dye C, Davies CR, Lainson R. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Anim Behav* 1991;42(2):183-192.
  34. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh R, Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 1993; 30(2):427-35.
  35. Taniguchi HH, Tolezano JE, Larosa R, Elias CR, Galati EAB. Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, 1996-1997. I- Sazonalidade e frequência de *L. ayrozai* em diferentes ecótopos com animais sentinelas em ambiente florestado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61 (2): 103-112.
  36. Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim Behav* 1997; 53: 721-31.
  37. 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: 185-193.

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

Tabela 1 – Número de flebotomíneos capturados em armadilhas tipo Disney instaladas em áreas de mata no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, município de Bela Vista, MS, maio de 2004 a abril de 2006.

Espécies	Local Sexo	Pista de Corda		Pista de 1 <sup>os</sup> Socorros		Área de Acampamento		Base do 1º Esquadrão		Pista de Sobrevivência Margem		Pista de Sobrevivência Fundo		Total		Total Geral	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	n	%
		<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	4	14	8	186	6	70	5	25	-	22	5	148	28	465	493
<i>Brumptomyia avellari</i>	-	-	-	-	1	-	3	-	-	-	-	-	4	0	4	0,34	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	-	-	1	2	-	-	-	1	-	-	-	3	1	4	0,34	
<i>Evandromyia bourrouli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	556	95	26	5	582	100	682	57,26	
<i>Evandromyia lenti</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	2	0,17	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	2	-	2	0,17	
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	0,08	
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	-	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,08	
<i>Psathyromyia shannoni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	0,08	
<i>Sciopemyia sordellii</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,08	
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>187</b>	<b>10</b>	<b>71</b>	<b>32</b>	<b>29</b>	<b>558</b>	<b>117</b>	<b>9</b>	<b>151</b>	<b>622</b>	<b>569</b>	<b>1.191</b>	<b>100,00</b>	



Figura. 1. Armadilha de Disney modificada, instalada em áreas de mata no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, município de Bela Vista, MS.

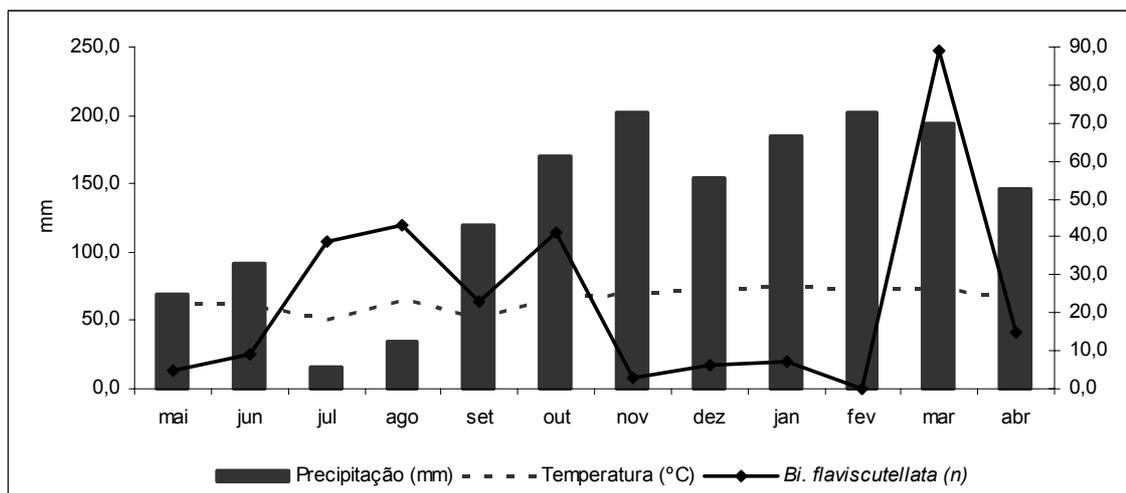


Figura 2- Precipitação e média mensal das temperaturas de maio de 2005 a abril de 2006, e distribuição mensal dos espécimes de *Bi. flaviscutellata* capturados com armadilha de Disney em área de mata do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, município de Bela Vista, MS.

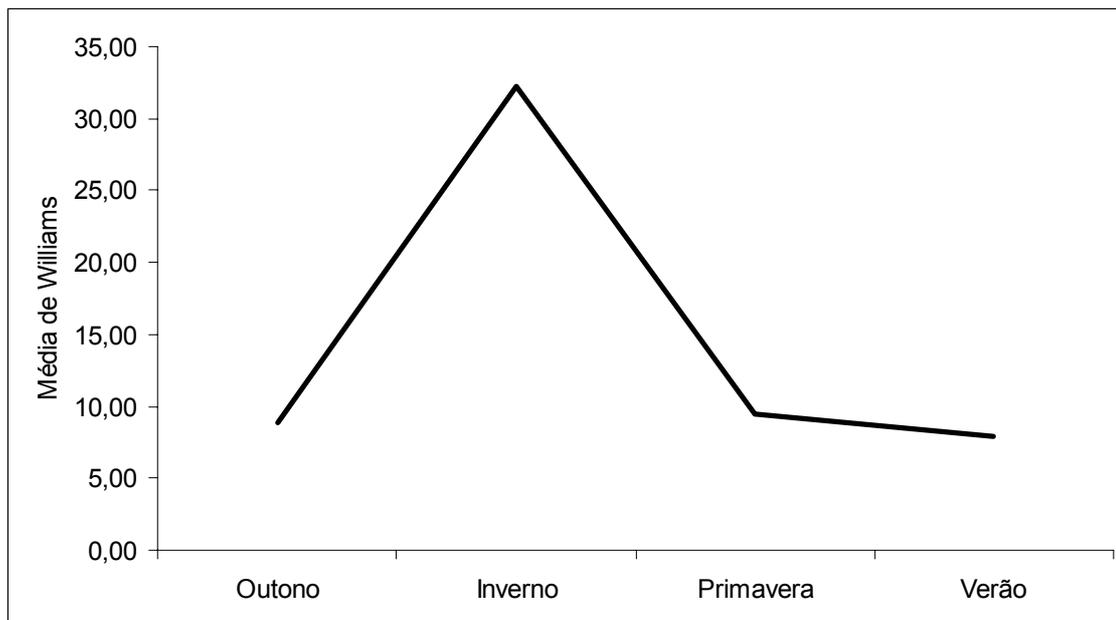


Figura 3- Distribuição sazonal de fêmeas de *Bi. flaviscutellata* capturadas em armadilhas de Disney instaladas em área de mata do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, município de Bela Vista, MS, de maio de 2005 a abril de 2006.

## **ARTIGO 4**

**Modificação da armadilha de Disney para captura de flebotomíneos**

**A ser submetido à publicação**

## **Modificação da armadilha de Disney para captura de flebotomíneos**

### *Modification of Disney trap for captures of phlebotomines*

Maria Elizabeth C. Dorval<sup>1</sup>, Tulia Peixoto Alves<sup>2</sup>, Alessandra Gutierrez de Oliveira<sup>1</sup>, Reginaldo Peçanha Brazil<sup>3</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>

Resumo: Descrevem-se modificações realizadas no modelo da armadilha de Disney, visando maior praticidade no manejo da armadilha e na coleta dos espécimes de flebotomíneos, bem como proteção da isca animal e maior durabilidade da armadilha em nível de campo.

Palavras chave: Phlebotominae; Psychodidae; armadilha tipo Disney

*ABSTRACT: This paper describes the modifications of Disney's trap, aiming more practicability in handling the trap, in the collection of specimens as well the protection in the animal bait and long lasting of traps in the field.*

*Key-words: Phlebotominae, Psychodidae, Disney's trap*

1 Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. 2 Acadêmica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 3 Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ. 4 Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP. 5 Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, Campo Grande, MS.

Apoio Financeiro: FUNDECT/DECIT/Protocolo 00645-03 e UFMS.

Os flebotomíneos são dípteros de grande importância em saúde pública que, além de serem vetores de protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses, são incriminados como vetores de arboviroses e bartonelose<sup>1, 2, 3</sup>.

Diferentes métodos de captura são necessários para os estudos que visam conhecer aspectos comportamentais, taxonômicos ou ecológicos das espécies vetoras bem como a inter-relação com os parasitos por elas transmitidos<sup>4</sup>.

Um dos tipos de armadilha com atratividade de isca animal inclui a de Disney<sup>5</sup>, que consiste de uma bandeja de metal que contém no centro uma gaiola com a isca escolhida. Sobre a bandeja é espalhado óleo para a captura dos insetos que ao pousar em sua superfície, antes ou após o repasto sangüíneo sobre a isca, permanecem aderidos.

Durante a realização de pesquisa sobre a fauna flebotomínea em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar, em reserva florestal do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, visando a captura de espécies de hábito zoofílico e de vôo baixo, foi observado que conforme modelo descrito por Maroli et al.<sup>6</sup> (1997) as armadilhas não apresentavam condições de permanência nas matas durante longo período de observação e também não ofereciam segurança ao animal utilizado como isca, hamster (*Mesocricetus auratus*).

Assim sendo, foi confeccionada uma armadilha em chapa galvanizada, medindo 50 x 50cm, com cantoneiras de alumínio, que continha na parte superior e inferior, duas placas corrediças que eram untadas com óleo de rícino. Essas placas móveis facilitaram o manejo e a limpeza da armadilha quando da coleta dos espécimes nela aderidos, além de permitir proximidade suficiente para a melhor visualização dos mesmos. Os pés foram feitos para serem removíveis a fim de facilitar a instalação da armadilha, na dependência do local selecionado (Figs. 1 e 2).

Em nossos estudos, os animais ficaram alojados individualmente, em gaiolas de plástico, de acordo com as recomendações de densidade populacional (Institute of Laboratory Animal Resources)<sup>7</sup>, com cama de maravalha de *Pinnus* sp e recebiam água e ração comercial Nuvilab CR-1® (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) à vontade.

Esse tipo de gaiola foi mais segura para a proteção do animal e impediu que os resíduos alimentares e os dejetos caíssem sob as placas, danificando os insetos,

bem como, dificultando a visualização e retirada dos mesmos. Semanalmente, as gaiolas eram limpas e a alimentação complementada. Contra intempéries, utilizou-se tampa de fibra de vidro.

Considerando as dificuldades encontradas na área estudada, para maior segurança do animal construiu-se uma proteção com barras de ferro que permanecia fechada com cadeado evitando perturbação às armadilhas e retirada dos animais. Além disso, predadores naturais não conseguiam ter acesso ao animal (Fig. 3). Dos 36 animais que permaneceram como sentinelas apenas dois morreram.

Foi possível a captura de 1.191 flebotomíneos, que representaram 59,6% do total de espécimes mostrando-se, portanto, o método mais produtivo, quando comparado com armadilhas automáticas luminosas e de Shannon (Dorval et al. em preparação). Isto possivelmente é explicado pela possibilidade da armadilha permanecer capturando diariamente, ao passo que as demais foram instaladas periodicamente e apenas no período noturno.

Além de ter sido mais rendosa, mostrou-se bastante seletiva em relação à captura de algumas espécies. *Evandromyia bourrouli* foi capturada exclusivamente com este tipo de armadilha representando 57,3% do total de flebotomíneos capturados. Uma outra espécie, *Bichromomyia flaviscutellata*, espécie sabidamente rodentofílica, embora tenha sido capturada com outras técnicas, 94,1% dos espécimes foram na Disney e destes, 81,7% eram fêmeas.

O uso deste tipo de armadilha em períodos diurnos ou noturnos possibilitaria o estudo do comportamento da atividade diária dos flebotomíneos.

### **Agradecimento**

Ao Jorge da Silva Oliveira pela elaboração dos desenhos.

---

## Referências

1. Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Póvoa MM, Lima JAN, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 1251-1259.
2. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4 (1): 1-24.
3. Sherlock I. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. (eds). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 15-21.
4. Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2000; 14: 109-122.
5. Disney RHL. A trap for phlebotomine sand flies attracted to rats. *Bull Entomol Res* 1966; 56: 445- 451.
6. Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Métodos de captura, conservación y montaje de los flebótomos (Diptera: Psychodidae). Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) OPS/HCP/HCT/95/97; 1997. 72p.
7. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. *Guide for care and use of laboratory animals*. National Academic Press; 1996.

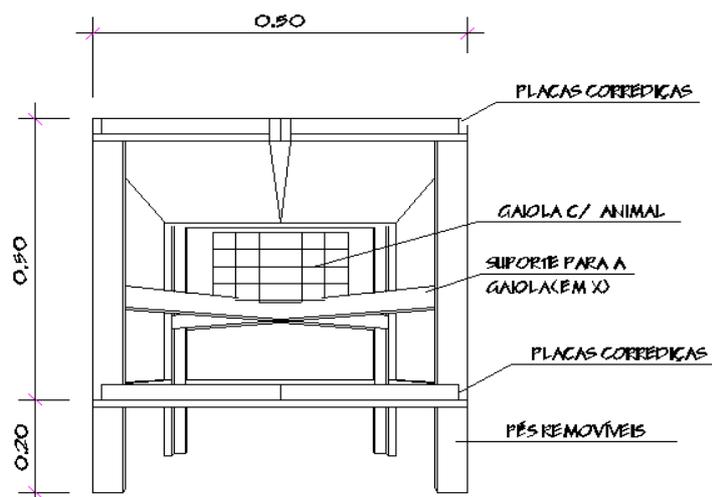


Figura 1- Desenho esquemático da armadilha Disney modificada.

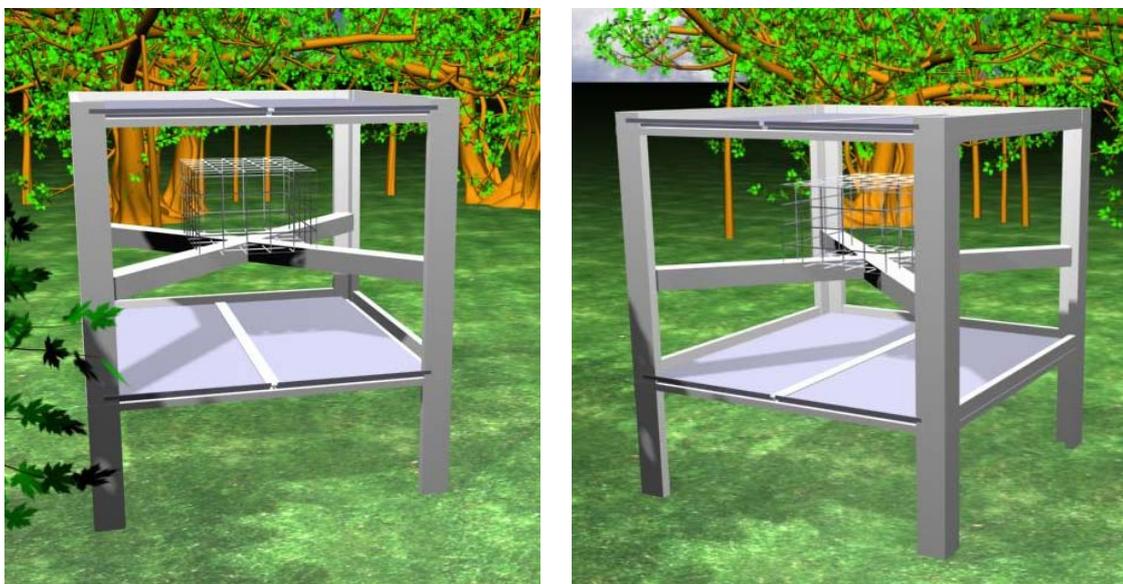


Figura 2- Desenhos da armadilha Disney modificada.



Figura 3- Armadilha Disney modificada, instalada em área de mata no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.

## **ARTIGO 5**

**Infecção natural em hamster (*Mesocricetus auratus*) sentinela em área de leishmaniose tegumentar associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

**A ser submetido à publicação**

**Infecção natural em hamster (*Mesocricetus auratus*) sentinela em área de leishmaniose tegumentar associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**

*Natural infection in sentinel hamster (Mesocricetus auratus) in area of tegumentary leishmaniasis due Leishmania (Leishmania) amazonensis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil*

Maria Elizabeth C. Dorval<sup>1</sup>, Ricardo Amaral de Lemos<sup>2</sup>, Elisa Teruya Oshiro<sup>1</sup>, Geucira Cristaldo<sup>1</sup>, Alessandra Gutierrez de Oliveira<sup>1</sup>, Reginaldo Peçanha Brazil<sup>3</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>

**Resumo:** Durante o período de maio de 2004 a abril de 2006, em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar, realizaram-se capturas de flebotomíneos utilizando-se armadilhas tipo Disney modificadas. Dentre 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*) utilizados como sentinelas dois adquiriram a infecção por *Leishmania*. O parasito isolado foi caracterizado *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A principal característica histológica foi a ocorrência de reação inflamatória do tipo granulomatoso, constituída predominantemente por macrófagos com o citoplasma contendo numerosas formas amastigotas. A infecção natural desses animais constitui objeto deste relato.

**Palavras-Chave:** *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Animal sentinela, Infecção natural

**Abstract:** Captures of phlebotomines were undertaken in an area with the occurrence of tegumentary leishmaniasis using modified Disney traps, during the period from May 2004 to January 2006. Two of 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*) used as bait resulted infected by *Leishmania (Le.) amazonensis*. The main histological characteristic was represented by an inflammatory reaction of the granulomatous type, constituted predominantly by macrophages with cytoplasm having numerous amastigote forms. This present paper report the natural infection of these animals.

**Key-words:** *Leishmania (Le.) amazonensis*, Sentinela animal, Natural infection

1 Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. 2 Faculdade de Medicina Veterinária da UFMS, Campo Grande, MS. 3 Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ. 4 Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP. 5 Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMS, Cx. Postal 549, Campo Grande, MS.

Apoio Financeiro: FUNDECT/DECIT/PROTOCOLO 00645-03 e UFMS.

## Introdução

A leishmaniose tegumentar cuja etiologia é atribuída a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tem sido assinalada na Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai. No Brasil vem sendo isolada de formas cutâneas, mucocutâneas, difusa e visceral, encontrando-se presente na região amazônica, no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do país <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>.

Em Mato Grosso do Sul, Dorval et al. <sup>6</sup> (2006) relataram pela primeira vez a ocorrência desta espécie de parasito em pacientes que haviam realizado atividades de instrução militar na cidade de Bela Vista. Estudos entomológicos preliminares demonstraram a presença do seu principal vetor, *Bichromomyia flaviscutellata* <sup>7</sup>.

Sabendo-se que o conhecimento da fauna flebotomínea local e seu hábito alimentar são pré-requisitos para a compreensão da epidemiologia da LT em cada área em estudo, armadilhas tipo Disney, com isca animal hamster, (*Mesocricetus auratus*), foram instaladas no local com vistas a estudar o comportamento da fauna flebotomínea. A infecção natural do animal sentinela constitui o objetivo do presente relato.

## Material e Métodos

### Área de estudo

O estudo foi realizado em uma reserva do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec), localizado na zona urbana de Bela Vista, município situado na região sudoeste de Mato Grosso do Sul, na micro-região geográfica de Bodoquena, onde o contingente militar realiza suas atividades de instrução militar.

### Exposição dos animais sentinelas

Foram utilizadas armadilhas tipo Disney <sup>8</sup> modificadas (Fig. 1), com isca roedor, hamster (*Mesocricetus auratus*). Os trabalhos tiveram início em maio de 2004 estendendo-se até abril de 2006.

Os animais ficaram individualmente alojados em gaiolas de plástico de acordo com as recomendações de densidade populacional <sup>9</sup>, com cama de maravalha de *Pinnus* sp e recebiam água e ração comercial Nuvilab CR-1® (Nuvital, Curitiba, PR,

Brasil) à vontade, e semanalmente, as gaiolas eram limpas e a alimentação complementada.

Para a proteção do animal, principalmente contra predadores naturais e para evitar a ação do homem, tendo em vista o longo tempo de permanência da armadilha na mata, a mesma foi protegida por uma outra gaiola construída com barras de ferro, mantidas fechadas com cadeado. Além disso, revestiu-se o conjunto de gaiolas com telas de malhas grossas para impedir a entrada de predadores. Contra as intempéries, a armadilha permanecia coberta com tampas de fibra de vidro.

Foram utilizados animais adultos jovens, de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

As armadilhas foram instaladas no interior das matas, a cerca de 20 cm do solo, com troca do animal sentinela a cada três meses ou quando da observação do comprometimento do estado geral do animal (emagrecimento, alteração na pelagem, lesões de pele). Uma vez por semana, os animais eram observados em busca de possíveis lesões, e quando retirados das armadilhas, permaneciam no Biotério do Laboratório de Parasitologia da UFMS para seguimento de possível infecção por *Leishmania*.

### **Exame dos animais e isolamento do parasito**

Decorridos seis meses de observação no laboratório, ou quando do aparecimento de sinais compatíveis com LT, o animal era anestesiado com 0,70 mg/Kg de solução de Pentobarbital sódico a 10%, via intra-peritonal, eutanasiado por secção da artéria aorta abdominal e necropsiado para a colheita de fragmentos de pele, linfonodo, fígado e baço, os quais eram utilizados para a confecção de esfregaços por aposição, que após coloração pela técnica de Giemsa eram examinados para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*.

Com parte dos fragmentos, foi realizada também a semeadura em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) com fase líquida de meio Schneider (*Schneider's Insect Medium*, Sigma) acrescido de 20% de soro fetal bovino, para o isolamento do parasito. As culturas foram mantidas a 23°C em câmara de incubação BOD, modelo

347 CD, FANEM, e examinadas semanalmente a partir do sétimo dia, durante seis semanas consecutivas, para a pesquisa de formas promastigotas.

Fragmentos de pele, do linfonodo reativo, do fígado e baço foram fixados em formalina tamponada a 10%, incluídos em parafina histológica, submetidos a cortes de 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

### **Caracterização dos parasitos**

Para a extração de DNA da biópsia da lesão de orelha, foi utilizado o kit *GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (Amersham Biosciences - England), segundo instruções do fabricante.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) específica para a amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp:**

as reações de PCR foram desenvolvidas com os oligonucleotídeos **150** (5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3') e **152** (5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3'), descritos por Passos et al. <sup>10</sup> (1996). O volume final de cada reação foi de 10µl, contendo 10 mM de TrisHCl (pH 8,0), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dTTP, dCTP dGTP), 0,75 U de Taq DNA polimerase (PhN, Belo Horizonte-MG), 1,0µmol de cada oligonucleotídeo, 100fg de DNA molde das cepas referência (controle positivo) ou 1µl de DNA proveniente de biópsias. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94° C por 5 min, anelamento a 55° C por 1 min, 29 ciclos de 1 min de desnaturação a 94° C e 1 min de anelamento a 55° C, 10 seg de extensão a 72° C. O último passo foi 72° C por 5 min, para extensão final.

Para a análise dos produtos de amplificação, alíquotas dos produtos de PCR e marcadores de peso molecular (100pb) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4%. O gel foi corado com nitrato de prata.

**Eletroforese de isoenzimas (MLEE):** as amostras foram analisadas segundo Cupolillo <sup>11</sup> (1994) e os perfis obtidos foram comparados com os zimodemas que já haviam sido descritos com base nas enzimas estudadas <sup>11, 12</sup>. Foram utilizados 2 *loci* enzimáticos: 6 fosfo gluconato desidrogenase /1.1.1.43 (6PGDH) e isocitrato

desidrogenase /1.1.1.42 (IDH), selecionados de acordo com o Laboratório de Referência do IOC-Fiocruz. A seleção dos *loci* baseou-se na suspeita da espécie encontrada no local de isolamento das amostras. A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel de agarose 1%. A posição exata das bandas no gel foi determinada pela comparação entre o padrão apresentado pelas cepas referência de *Leishmania* e as bandas apresentadas pelos isolados.

## Resultados

Foram utilizados no total, 48 hamsters, porém, devido às dificuldades encontradas em relação à manutenção das armadilhas na área, e ao insucesso no tempo de exposição dos animais no primeiro ano do estudo, foram considerados como sentinelas, 36 hamsters, e a despeito da morte de dois animais e do tempo de permanência nas armadilhas, não foram observados sinais de sofrimento nos animais.

Dos 34 hamsters sentinelas que cumpriram o período de exposição, 32 foram considerados negativos, e dois apresentaram lesões sugestivas de LT. O índice de infecção foi, portanto, de 5,9%. Os animais positivos haviam sido colocados nas armadilhas no mês de março de 2006, e retirados no final do mês de abril quando do término dos trabalhos de campo. As lesões foram observadas dois meses depois.

**Diagnóstico parasitológico:** em um dos animais a presença de numerosas formas amastigotas, grandes e vacuolizadas foi constatada nos esfregaços por aposição de fragmentos de pele da orelha, do linfonodo, fígado e baço (Fig. 2). O crescimento em cultura apresentou riqueza de formas promastigotas a partir do terceiro dia de cultivo da pele, do linfonodo e do baço.

No segundo animal formas amastigotas com as mesmas características descritas foram observadas apenas na pele e não foi possível o isolamento do parasito devido à contaminação das culturas.

**Exame clínico e histopatológico: Hamster 1:** o animal apresentou acentuado emagrecimento e linfadenopatia satélite. Foi observada a presença de lesões nodulares coalescentes que atingiam toda a extensão da orelha. Essas áreas apresentavam-se espessadas, edemaciadas e alopecicas, com a região central ulcerada e recoberta por crostas (Fig. 3 A).

À histopatologia, a epiderme apresentou focos extensos de hiperqueratose intercalados por pequenas pústulas com áreas de necrose de coagulação que afetavam todas as camadas de células da epiderme, alcançando a derme. Na derme havia severa reação inflamatória granulomatosa difusa, constituída predominantemente por infiltrado de macrófagos e linfócitos, discreta presença de plasmócitos e raros neutrófilos. No citoplasma dos macrófagos foram observadas numerosas formas amastigotas de *Leishmania* (Fig. 4).

No baço, aumentado de volume, foi observada discreta hiperplasia da polpa branca. No linfonodo, discreta hiperplasia dos centros germinativos. No fígado foram observados discretos acúmulos linfocitários distribuídos aleatoriamente no parênquima. Alguns macrófagos multinucleados com pigmento marrom intracitoplasmático também foram observados.

**Hamster 2:** o estado geral do animal foi considerado bom. Na orelha esquerda observou-se múltiplos nódulos de contornos definidos, superfície lisa e alopecica associados a múltiplos focos de ulceração crostosa (Fig. 3 B).

Na histopatologia, a pele da orelha apresentou severa reação inflamatória difusa na derme, caracterizada por infiltrado constituído predominantemente por macrófagos e linfócitos, e em menor quantidade, plasmócitos. No citoplasma dos macrófagos podiam ser vistas numerosas formas amastigotas de *Leishmania*.

No fígado foram observados múltiplos focos discretos de infiltrado de macrófagos distribuídos aleatoriamente. Os macrófagos apresentavam tendência a se agruparem formando células multinucleadas.

Em nenhum dos animais foi observada lesão metastática em outras áreas descobertas do corpo.

**Caracterização dos parasitos:** após a análise dos produtos de amplificação, o tamanho dos fragmentos de DNA gerados pelas amostras foi de aproximadamente 120pb, compatível com o fragmento gerado pela amplificação da cepa referência de *Le. amazonensis*. O perfil isoenzimático apresentado pelos isolados foi analisado comparando com os observados para cepas de referência de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis* e *Le. chagasi*, permitindo assim a identificação dos parasitos como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

## Discussão

O hamster, devido a sua suscetibilidade, é um animal amplamente utilizado como modelo experimental nas leishmanioses<sup>13</sup>, e sua exposição, sob condições naturais, pode constituir um modelo útil para demonstrar a infecção por *Leishmania* em determinada área<sup>14, 15, 16</sup>, no entanto, para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses é de fundamental importância o achado da infecção em seus hospedeiros naturais<sup>17, 18</sup>.

O animal sentinela utilizado demonstrou ser viável para verificar a presença de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na área e sua circulação nos vetores, o que foi evidenciado pelas manifestações clínicas, pela visualização do parasito por técnicas parasitológicas e histológicas, pelo isolamento do agente em meio específico a partir de material biológico de um animal naturalmente infectado, e o fato de que a infecção natural foi coincidente com uma época em que o vetor, *Bichromomyia flaviscutellata*, foi a única espécie capturada nas armadilhas e esteve presente em alta densidade (Dorval et al. em preparação).

Trabalhos anteriores realizados com objetivo semelhante ao deste estudo utilizaram espécies de animais silvestres da fauna local como sentinelas<sup>8, 14, 15, 19, 20, 21, 22</sup>.

Diferentes espécies de roedores têm sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania amazonensis* e em algumas áreas, com elevada incidência<sup>19, 21, 23</sup>, sendo os do gênero *Proechimys* considerados os mais importantes reservatórios desta espécie de parasito<sup>5</sup>.

Embora a taxa de infecção observada no presente estudo (5,9%) seja inferior à observada em algumas espécies silvestres<sup>19, 22, 24, 25, 26, 27</sup>, o hamster apresentou vantagens em relação à utilização de espécies da fauna local como sentinelas. A principal vantagem diz respeito à sensibilidade desse animal a *Leishmania* sp. Menciona-se ainda a resistência e a fácil manipulação desse animal no campo, e por se tratar de animais seguramente livres da infecção, possibilita a caracterização da evolução do quadro clínico e patológico da infecção. Outro ponto a ser considerado é que este tipo de modelo animal dispensou a utilização de espécies silvestres, que além de apresentar dificuldades inerentes à captura e ao manejo, poderia ser causa de impacto ambiental nas áreas estudadas. As armadilhas utilizadas demonstraram

biossegurança tanto para a proteção da isca contra possíveis predadores, como também impedindo a fuga dos animais.

Ressalta-se a maior sensibilidade do animal sentinela utilizado para constatar a presença do parasito quando comparado a outras espécies silvestres. Este fato é evidenciado pelos relatos de isolamento desta espécie de parasito em reduzido número de marsupiais<sup>27, 28</sup>. Adicionalmente, a utilização de espécies de laboratório não apresenta limitações quanto ao número de animais, de maneira que, embora o índice de positividade não possa ser alterado, a sensibilidade do modelo em números absolutos pode ser elevada, pois se a infecção foi identificada em dois de 34 hamsters sentinelas, espera-se que aumentando o número de sentinelas, ocorra também um aumento no número de casos da infecção.

A mortalidade elevada de hamsters sentinelas como relatado por Herrero et al.<sup>15</sup> (1973), decorrente provavelmente da circulação de arbovírus nas áreas de matas estudadas<sup>29</sup>, não foi observada no presente estudo.

O quadro clínico e patológico da lesão cutânea dos hamsters deste estudo foram semelhantes a relatos anteriores da infecção experimental nesta espécie<sup>30, 31</sup>, e também em camundongos<sup>32</sup> e humanos<sup>33</sup>.

Cumprido salientar que um hamster apresentou formas amastigotas em impressões de linfonodo, fígado e baço, porém, nos cortes histológicos as mesmas não foram visualizadas. A visceralização de *Le. amazonensis* é descrita em humanos<sup>2</sup> e camundongos<sup>32, 34</sup>, entretanto, Lainson e Shaw<sup>35</sup> (1979), mencionaram que em roedores nem sempre a divisão entre apresentação cutânea e visceral é clara. Relataram também que o achado de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) mexicana* em órgãos de cricetídeos por eles estudados não deveriam ser considerados como visceralização da doença, uma vez que a presença do agente nestes órgãos não estava relacionada a manifestações clínicas ou lesões.

A não observação do parasito em cortes histológicos do linfonodo, baço e fígado indica que a sensibilidade do exame histológico foi inferior a do esfregaço por aposição.

Embora necessitando de investigações, conclui-se que os roedores têm importância no ciclo enzoótico da leishmaniose tegumentar na área estudada,

porém, a participação desses mamíferos na circulação de *Le. amazonensis* precisa ser esclarecida para determinar a sua importância na difusão da doença.

### Agradecimentos

Ao comando e aos militares do 10º RCMec pelo incondicional apoio à pesquisa e aos membros da equipe. À Coordenadoria de Controle de Vetores da Secretaria de Estado de Saúde, na pessoa do Sr. Elias Monteiro pelo apoio logístico. Ao Claudemar Borges Dias pela colaboração nas capturas e cuidados com os animais.

### Referências

1. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Lonardon MVC, Dias MLGG, 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 (4): 475-476.
2. Barral A, Sampaio DP, Grimaldi Jr G, Momem H, Pratt DMM, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Netto MB, Carvalho EM, Johnson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 536-546.
3. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 427-434.
4. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, 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 Tropica 2000; 74 (1): 89-93.
5. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox, JP Kreir, D Wakelin (eds). Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Topley & Wilson's, Arnold, Sydney, Auckland; 2005. p. 313-349.
6. Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo ANC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 43-46.
7. Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Rocha HC, Peixoto T, Alves MA, et al. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of an area of cutaneous leishmaniasis in municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul state, Brazil. Proceedings of ISOPS V. Arch Inst Pasteur Tunis 2005; 82:107.

8. Disney RHL. A trap for phlebotomine sand flies attracted to rats. *Bull Entomol Res* 1966; 56: 445- 451.
9. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. National Academic Press; 1996.
10. Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1996; 91: 19-20.
11. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New World leishmaniasis using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 296-311.
12. Grimaldi G, Jr., Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild animals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44 (6): 645-661.
13. Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In: Peter W, Killick-Kendrick R. (eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 291-363.
14. Christensen, HA, Herrer A. Attractiveness of sentinel animals to vectors of leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22 (5): 578-584.
15. Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Detection of leishmanial activity in nature by means of sentinel animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1973; 67 (6): 870-879.
16. Herrer A. Use of the golden hamster as sentinel animal in areas where uta (cutaneous leishmaniasis) is endemic. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 1982; 24 (3): 162-167.
17. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4 (1): 1-24.
18. De Lima H, De Guglielmo Z, Rodriguez A, Convit J, Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (2): 169-174.
19. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 385-395.
20. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. II. Observations on enzootic leishmaniasis in the lower Amazon region – the feeding habits of the vector *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 396-405.
21. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66: 709-717.

22. Shaw JJ, Lainson R, Ward RD. Leishmaniasis in Brazil. VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66 (5): 718-723.
23. Ready PD, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of "pian -bois" (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forest in eastern Amazônia. *Trans R Soc Med Hyg* 1983; 77(5): 775-785.
24. Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Povoá M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 530-536.
25. 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 (5): 654-667.
26. Arias JR, Naif RD, Miles MA, de Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 537-541.
27. Arias JR, Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV. Observations on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and its natural infection of the sand fly *Lutzomyia olmeca nociva*. *Bull Pan Am Health Organ* 1987;21(1):48-54.
28. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. III. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63 (6): 738-740.
29. Tikassingh ES. Letter: Hamsters as sentinels for leishmaniasis and arboviruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974; 68 (3): 261-262.
30. Duarte MI, Laurenti MD, Andrade Junior HF, Corbett CE. Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 1988; 30 (1): 21-27.
31. Arruda MSP, Nogueira MES, Bordon AP. Histological evaluation of the induced by inoculation of *Leishmania mexicana* in the cheek pouch of the hamster. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35 (4): 293-297.
32. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SM, Cardoso FO, Souza CS, Gonçalves da Costa SC. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 2004; 121: 179-187.
33. Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1994; 36 (5): 459-463.

34. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54 (2): 178-184.
35. Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA (eds). *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press; 1979. p. 1-116.



Figura 1- Armadilha de Disney modificada instalada em área de mata no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, Bela Vista, MS.



Figura 3 A, B-. Aspecto macroscópico das lesões em orelha esquerda de hamsters naturalmente infectados por *Le. amazonensis*, Bela Vista MS.

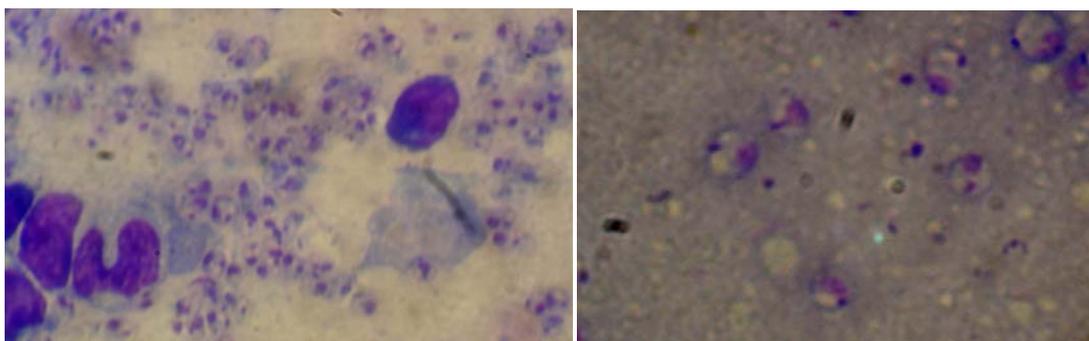


Figura 2- Hamster naturalmente infectado por *Le. amazonensis*. Esfregaço por aposição de pele de orelha. Observar a presença de numerosas formas amastigotas grandes e vacuolizadas (Giemsa 1000x).

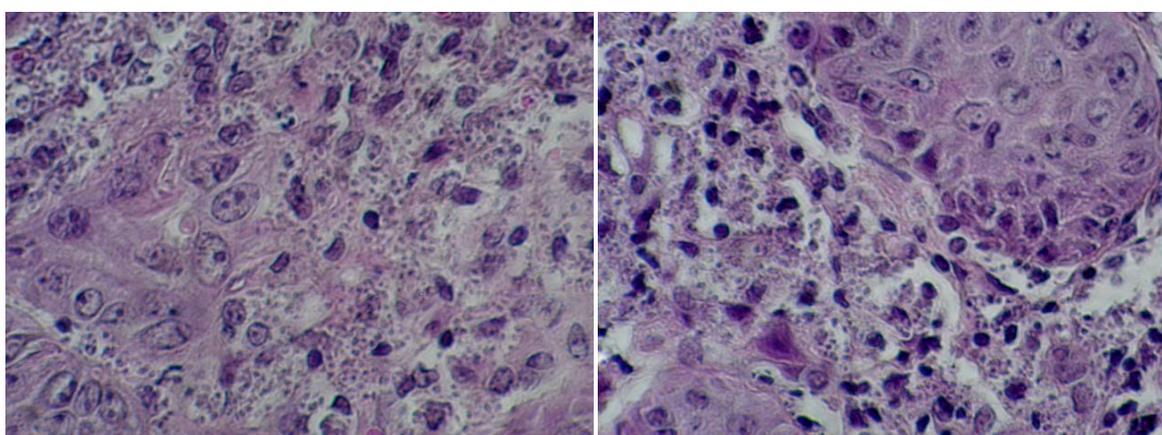


Figura 4- Hamster naturalmente infectado por *Le. amazonensis*. Histopatologia de pele de orelha. Lesão granulomatosa com infiltrado predominantemente de macrófagos intensamente parasitados (HE 400x).

## 5. DISCUSSÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia* e *Leishmania*, e são transmitidas por diferentes espécies de dípteros flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae <sup>149</sup>.

A LT é considerada no Brasil uma doença em expansão e representa importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas, encontrando-se relacionada não somente às mudanças ambientais que aumentam a exposição do homem aos seus vetores, como também, a fatores de risco individuais que determinam a forma de evolução da infecção <sup>45, 150</sup>.

No Brasil sete espécies de *Leishmania* incluídas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* são incriminadas como agentes etiológicos da LT <sup>36, 151</sup>. Dentre estas, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, é encontrada principalmente na bacia amazônica (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), porém, vem sendo relatada no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do país <sup>32, 33, 75, 76, 77, 120, 150</sup>.

Assim, o trabalho “**Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***” vem ampliar o conhecimento sobre sua presença em território nacional, confirmando sua amplitude de distribuição geográfica.

A maior importância desta espécie de parasito deve-se ao fato de ser responsável, em indivíduos com comprometimento da resposta imunológica celular, pela forma difusa ou anérgica da doença, de rara ocorrência, de caráter deformante, e até o momento, considerada de difícil tratamento ou incurável <sup>5, 23, 36</sup>, embora a doença possa manifestar-se por um amplo espectro de formas clínicas <sup>32, 36</sup>.

Quanto à forma clínica da LT associada a *Le. (Le.) amazonensis*, todos os pacientes apresentaram lesões cutâneas únicas e ulceradas, sendo esta a mais freqüente forma de apresentação da parasitose <sup>18</sup>.

Todos os pacientes eram procedentes do Estado de Mato Grosso do Sul, residentes em zona urbana e relataram não ter freqüentado áreas de ocorrência da parasitose, demonstrando a autoctonia dos casos.

A transmissão da doença provavelmente ocorreu durante as atividades de instrução militar, uma vez que, os pacientes eram militares do 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado, localizado na cidade de Bela Vista, MS, que permaneceram na reserva durante cinco dias e quatro noites consecutivas.

Foram registradas lesões localizadas em áreas descobertas na parte superior do corpo, tais como, orelha, nuca, antebraço, punho e face, o que pode ser explicado pelo tipo de atividades desenvolvidas nos treinamentos, em contato direto com o solo no período noturno, ou ainda, pelo pernoite dos militares na mata, tendo em vista que o vetor do parasito tem hábitos noturnos e apresenta vôo baixo, raramente acima de 1m do solo<sup>82, 152</sup>.

O presente relato está de acordo com as observações de que o serviço militar associado a atividades em ambientes florestais, propicia o contato do homem com os flebotomíneos vetores de LT, possibilitando a ocorrência de elevados índices de infecção entre as tropas brasileiras, principalmente na região amazônica e, embora no Brasil, não existam estimativas divulgadas tomando-se como parâmetros a perda de mão-de-obra e as despesas com o tratamento dos indivíduos infectados, é patente a importância econômica da LT entre o pessoal militar<sup>74, 153, 154, 155, 156</sup>.

Sabe-se, contudo, que a distribuição das espécies de *Leishmania* está condicionada à presença dos vetores e de seus reservatórios; e a infecção do homem depende de suas relações com a cadeia de transmissão do parasito<sup>1, 80</sup>.

Assim, com o conhecimento sobre a etiologia e algumas características clínicas da parasitose na área, e reconhecendo a necessidade de estudos sobre a sua estrutura epidemiológica, visando a determinação de fatores envolvidos na sua transmissão, foi realizado um estudo sobre a fauna flebotomínea para identificar espécies potencialmente vetoras de LT, mas sobretudo a *Bi. flaviscutellata*, o principal vetor da *Leishmania amazonensis*.

O trabalho "**Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de área de leishmaniose tegumentar associada a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**" revelou a presença de 17 espécies de

flebotomíneos na área estudada, e embora tenham sido encontradas em baixas densidades, ficou demonstrada a ocorrência de uma fauna diversificada.

A complexidade epidemiológica da LT impõe estratégias de controle flexíveis e adequadas a cada região ou foco de infecção, e o conhecimento da fauna flebotomínea constitui-se em importante ferramenta para a compreensão da dinâmica de transmissão dessa parasitose, a ser considerada no planejamento de medidas de prevenção e controle <sup>47</sup>.

Armadilhas automáticas luminosas têm sido sistematicamente utilizadas em estudo de vetores em áreas de transmissão de leishmanioses, e embora, nem sempre, permita a captura da diversidade local de espécies, quando realizada em diferentes sítios de captura, oferece uma amostra representativa dos flebotomíneos existentes nas áreas estudadas <sup>157, 158, 159</sup>.

A armadilha de Shannon, idealizada para atrair e capturar mosquitos utilizando isca animal ou luminosa <sup>160</sup>, é útil para capturas de espécies antropofílicas, uma vez que além do estímulo luminoso, estando o homem presente durante as coletas, este atua como isca, refletindo o hábito alimentar das espécies que ali comparecem atraídas pelo odor e pela liberação de CO<sub>2</sub> <sup>159, 161, 162</sup>.

No presente estudo, esses dois métodos de captura foram eficazes para revelar a diversidade de espécies. Observou-se que os maiores índices de diversidade das espécies foram encontrados na mata, o que pode ser explicado pelo fato dos flebotomíneos serem primitivamente de ambientes florestais, tendo seus criadouros no solo, entre raízes, sob rochas e pedras e folhas caídas e em tocas de animais <sup>101</sup>, muito comuns na área estudada. Também pela elevada frequência e abundância das espécies *Br. brumpti* e *Br. avellari*, de ampla distribuição na América, comumente associadas a tocas de tatus <sup>163</sup> e ambientes florestados. Além disso, os flebotomíneos são dotados de alta atratividade pela luz.

Associada a estas duas espécies, *Ev. lenti* também foi uma das mais abundante e esteve presente em todos os ambientes da área estudada. Já foi observada em ambientes antrópicos e em peridomicílios urbanos da capital, Campo Grande <sup>60, 144</sup> assim como em muitos municípios do Estado de Goiás, onde demonstrou associação significativa com os casos de LT <sup>164</sup>.

Em abrigos de animais domésticos, *Lu. longipalpis*, espécie de reconhecida importância na transmissão de LV na América Latina, foi a segunda espécie mais abundante. Destaca-se que foi freqüentemente encontrada nas baias existentes nas dependências do 10º RCMec, fato que corrobora dados da literatura que relatam a ocorrência de alta freqüência deste flebotomíneo em ambiente antrópico e em abrigos de animais, os quais servem como fonte de alimento <sup>165, 166</sup>.

Menciona-se sua presença quase que exclusiva em domicílios da área central da cidade, constituindo motivo de alerta para a saúde pública, haja vista a sua grande capacidade vetorial, o seu potencial de adaptação e dispersão, e a confirmação da leishmaniose visceral na população humana <sup>128</sup> e canina no município de Bela Vista, fatos estes, condizentes com o franco processo de expansão e urbanização da LV em Mato Grosso do Sul.

Ressalta-se que a presença e a criação de animais no peridomicílio aliadas às precárias condições de saneamento e higiene podem ser um fator de agregação não só para *Lutzomyia longipalpis* como também para outras espécies de flebotomíneos, aumentando o risco de transmissão de *Leishmania* <sup>165, 167</sup>.

Dentre as espécies antropofílicas, destaca-se o encontro de *Ps. punctigeniculata* que praticamente não compareceu nas capturas com CDC, porém, apresentou a freqüência mais elevada entre as fêmeas capturadas com armadilha de Shannon, o que reforça sua importância epidemiológica em potencial, como possível vetora de agentes infecciosos ao homem <sup>60</sup>.

*Psathyromyia shannoni*, também antropofílica, é uma espécie de ampla distribuição geográfica no continente Americano, e embora não esteja associada à transmissão das leishmanioses, tem sido coletada em ambientes antrópicos e em capturas com isca humana <sup>101, 168, 169</sup>. É incriminada como um importante transmissor de arboviroses e de um tripanossomatídeo exclusivo de preguiças <sup>170, 171</sup>. Já foi encontrada parasitada por flagelados indistinguíveis de *Leishmania* de origem humana <sup>172</sup> e, mais recentemente, Travi et al. <sup>173</sup> (2002) na Colômbia, demonstraram a infecção desta espécie por *Leishmania infantum*, sugerindo sua participação na veiculação deste parasito.

Foi também constatada a presença de *Ny. whitmani*, um dos mais importantes vetores de LT nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil e no Paraguai <sup>48, 56, 60, 168, 174, 175</sup>.

A presença de *Bi. flaviscutellata*, principal vetor de *Le. (Le.) amazonensis* foi constatada com a utilização dos dois métodos de captura, embora com baixas densidades. Sua ocorrência reveste-se, portanto, de grande significado epidemiológico, pelo fato de *Le. amazonensis* ter sido confirmada como agente etiológico dos casos humanos de LT ocorridos na área em estudo. A pouca atratividade deste flebotomíneo pelo homem, indiretamente avaliada pelo comparecimento de apenas 5,95% dos espécimes capturados na armadilha de Shannon, tem sido relatada em outras regiões <sup>152, 158, 169, 176</sup>.

Segundo Lainson e Shaw <sup>53</sup> (1979), o conhecimento das flutuações das populações de flebotomíneos, permite realizar orientações a fim de se evitar a freqüência aos habitats destes insetos durante os períodos do ano em que são mais abundantes, possibilitando assim o controle da transmissão para o homem.

Na área estudada, de um modo geral, os flebotomíneos foram capturados o ano inteiro, porém, no conjunto, os meses em que ocorreram as densidades mais elevadas demonstram que a estação mais seca é a mais favorável à emergência da maioria das espécies.

Quanto ao ritmo horário noturno dos flebotomíneos da área estudada, a maior concentração de espécimes ocorreu no intervalo compreendido entre 18:00 e 21:00 horas, devendo-se, portanto, reduzir o grau de exposição dos freqüentadores do local nesse período, quando pode haver maior risco de transmissão da LT.

Além do primeiro relato da ocorrência de *Evandromyia evandroi* no Estado de Mato Grosso do Sul, ficou demonstrada através deste trabalho, a presença na área em estudo, das três espécies de maior importância na transmissão das leishmanioses no Brasil <sup>36</sup>, quais sejam, *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Bi. flaviscutellata*, ampliando dessa forma o conhecimento a respeito da fauna flebotomínea no Estado.

Considerando a presença de *Bi. flaviscutellata* e o fato de que, segundo Gomes <sup>(44)</sup> (1992), as fronteiras de *Le. (Le.) amazonensis* têm-se mostrado mais amplas que a Amazônia e que seu principal vetor, vem apresentando capacidade de

adaptação a matas secundárias baixas, tipo capoeira e a outros ambientes modificados, necessitando estudos sobre sua estrutura epidemiológica nessas situações, foi realizado o trabalho **“Captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com armadilha de Disney em área de ocorrência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil”** com o objetivo de complementar as informações sobre esta espécie de flebotomíneo, dada a sua importância na veiculação do parasito diagnosticado na área em estudo.

Para tanto, foram realizadas capturas utilizando armadilhas tipo Disney <sup>177</sup>, associada à isca roedor, hamster (*Mesocricetus auratus*), tendo em vista que nesse método de captura não há interferência humana e nem luminosa, refletindo o maior poder de atração da isca animal para os flebotomíneos.

Considerando o grande número de espécimes coletado e a observação de que praticamente todas as fêmeas estavam ingurgitadas, foi possível também, determinar o hábito rodentofílico de *Evandromyia bourrouli*, espécie cujo hábitat inclui florestas e tocas de tatus <sup>99</sup>.

*Bichromomyia flaviscutellata* é reconhecidamente o principal vetor de *Le. amazonensis* <sup>36, 152,178</sup>, e embora já tenha sido relatada como sendo fortemente antropofílica <sup>179, 180</sup>, ainda é considerada uma espécie de pouca atração ao homem, e de hábitos noturnos <sup>82, 157, 169, 176, 181</sup>.

Isto ficou também demonstrado neste estudo, tendo em vista as baixas densidades obtidas para esta espécie com as capturas realizadas com armadilha automática luminosa (1,13%) e armadilha de Shannon (5,95%), constatando-se, portanto, o baixo grau de atratividade exercida pela luz e pelo homem para *Bi. flaviscutellata*.

Sabe-se que o conhecimento da fauna flebotomínea local e seu hábito alimentar são pré-requisitos para a compreensão da epidemiologia da LT em cada área em estudo. Assim, a captura de grande número de espécimes fêmeas na armadilha tipo Disney, corroborou as afirmativas sobre a preferência alimentar desta espécie por roedores <sup>82, 152, 179</sup>.

Observou-se que *Bi. flaviscutellata* encontrava-se dispersa em toda a área estudada e que a presença de grande quantidade de material orgânico depositado no solo da mata (folhas e restos de vegetais em decomposição, fezes de eqüinos e

resíduos antrópicos, incluindo-se restos de alimentos), assim como em uma clareira cujo entorno apresentava vegetação densa com predomínio do estrato arbóreo com espécies caducifólias podem estar favorecendo a ocorrência de criadouros. Por outro lado, a presença dos resíduos antrópicos, poderia propiciar as populações de roedores, que como visto são atrativos para esta espécie de flebotomíneo. Associa-se a isto a presença do homem no interior da mata em período noturno, aumentando as chances de obtenção de alimento para as fêmeas de flebotomíneos. Deste modo, são vários fatores atuando em sinergismo, resultando em aumento potencial para a transmissão da leishmaniose tegumentar na área.

Embora necessite investigações a respeito das espécies de roedores presentes na área de estudo, a presença simultânea do vetor e da espécie de *Leishmania* por ele transmitida <sup>182</sup>, pode ser considerado um fator preditivo de ocorrência de surtos de leishmanioses na área, quando da permanência noturna do contingente militar.

Coincidindo com as observações de Lainson e Shaw <sup>2</sup> (1972) em áreas florestais, que observaram aumento na população destes insetos durante a época mais seca, na área estudada, *Bi. flaviscutellata* também apresentou maior associação com períodos mais secos, constatado pela maior regularidade dos espécimes durante os meses de julho a setembro, e ainda, pela média de Williams 3,5 vezes maior durante o inverno em relação à das demais estações. É permitido supor, portanto, que o risco de transmissão de *Le. (Le.) amazonensis* também esteja aumentado se houver exposição da população humana na área neste período.

A ocorrência dos casos humanos na área <sup>182</sup> adquiridos provavelmente durante os meses de março e ou abril pode ser justificada pela presença de um pico de alta densidade de *Bi. flaviscutellata* ao final do verão (março), possivelmente ocasionado pela emergência de adultos em explosão, resultante da pupação simultânea de uma grande quantidade de larvas em 4º estágio que tiveram o estágio larval prolongado, devido a excesso de umidade do solo. Além disto, também pode ter ocorrido um aumento na população de roedores, atraídos por resíduos antrópicos, com a presença dos militares para as atividades de instrução. Nessas circunstâncias pode-se pensar numa maior circulação local da *Le. amazonensis*. A constatação da

infecção natural por essa leishmânia em dois animais sentinelas expostos durante o mesmo período, vem reforçar este ponto de vista.

Tendo em vista a constatação da eficiência da armadilha tipo Disney para a coleta de *Bichromomyia flaviscutellata* e a necessidade de adequação às condições de campo e dificuldades encontradas na área de estudo para a realização deste método de captura, o trabalho **“Modificação da armadilha de Disney para captura de flebotomíneos”** descreve as alterações realizadas no modelo proposto por Maroli <sup>110</sup> (1997), as quais garantiram maior segurança e proteção da isca animal, bem como praticidade na coleta dos espécimes de flebotomíneos e durabilidade da armadilha durante longo tempo de permanência no campo.

De fundamental importância para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses, é o achado da infecção natural em hospedeiros e vetores naturais <sup>13, 41</sup>. Com o trabalho **“Infecção natural em hamster (*Mesocricetus auratus*) sentinela em área de leishmaniose tegumentar associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil”** embora não tenha sido possível constatar a infecção no hospedeiro natural, foi possível demonstrar a transmissão da *Le. amazonensis* por mecanismo natural, uma vez que dois hamsters que permaneceram como sentinelas nas armadilhas de Disney apresentaram manifestações clínicas compatíveis com a doença. O parasito foi detectado por técnicas parasitológicas e histológicas, e isolado em meio específico a partir de material biológico dos animais expostos e infectados. Além disso, menciona-se o fato de que a infecção desses animais foi coincidente com uma época em que *Bi. flaviscutellata* foi a única espécie capturada nas armadilhas e esteve presente em alta densidade, evidenciando, indiretamente, o seu papel de transmissor do agente.

Segundo Killick-Kendrick <sup>13</sup> (1990) os seguintes atributos são propostos para a incriminação de espécies de flebotomíneos como vetor, a espécie de flebotomíneo deve estar presente na localidade onde ocorre a doença e durante a época de surgimento dos casos deve ser encontrada naturalmente infectada com a mesma espécie do parasito presente no homem, demonstrado pelo isolamento e identificação do parasito em ambos; a espécie deve picar o homem, além do

---

hospedeiro reservatório, e deve infectar-se experimentalmente em laboratório e ser capaz de transmitir o parasito a um animal suscetível.

Embora nenhum espécime de *Bi. flaviscutellata* naturalmente infectado tenha sido encontrado durante o presente estudo, a sua distribuição temporal coincidente com o provável período da infecção em humanos, o seu comparecimento à armadilha de Shannon, embora pouco freqüente, sugere ser antropofílico e a dominância na armadilha de Disney evidenciando seu hábito zoofílico, além de sua competência de transmitir o parasito ao hamster sentinela, um animal suscetível, constituem, portanto, importantes características de sua capacidade vetorial no ciclo de transmissão do parasito nessa área.

Os resultados obtidos permitem sugerir a existência de um ciclo enzoótico com a ocorrência periódica de transmissão humana, relacionada à permanência dos militares na área de floresta remanescente e de vegetação secundária, durante a realização das atividades de instrução militar, assim como em outras áreas de ocorrência de LT em Mato Grosso do Sul<sup>60, 140</sup>, nas quais a transmissão da doença está associada ao padrão silvestre, com a exposição do homem aos vetores em seu hábitat natural.

Assim, embora reconhecendo a importância das atividades militares, principalmente no que diz respeito à defesa de nossas fronteiras, impõem-se a necessidade do planejamento das atividades para épocas de menor densidade do vetor e a instituição de medidas de proteção individual, na tentativa de reduzir o contato com o vetor e o risco de aquisição do parasito.

## 6. CONCLUSÕES

Nove militares adquiriram leishmaniose tegumentar durante um treinamento no 10º Regimento de Cavalaria Mecanizado (10º RCMec) na cidade de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul. A manifestação clínica da doença foi sob a forma cutânea, com lesão única ulcerada presente em áreas descobertas do corpo.

Isolou-se e identificou-se pela primeira vez a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em pacientes procedentes do município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, ampliando-se, portanto, o conhecimento da distribuição geográfica desta espécie de parasito.

A fauna flebotomínea encontrada nos dois anos de estudo constituiu-se de oito gêneros e 19 espécies de Phlebotominae, sendo na mata, as mais abundantes *Evandromyia bourrouli* e *Bichromomyia flaviscutellata* e nos abrigos de animais domésticos, *Evandromyia lenti* e *Lutzomyia longipalpis*.

A maior diversidade de espécies foi observada na área de mata e dentre os abrigos de animais domésticos estudados, as baias apresentaram maior produtividade nas capturas, demonstrando a importância dos eqüinos como atrativo para os flebotomíneos, principalmente *Lutzomyia longipalpis*.

Constatou-se a presença de três importantes espécies na transmissão das leishmanioses no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *Leishmania chagasi* agente etiológico da leishmaniose visceral, *Nyssomyia whitmani*, reconhecido vetor da *Leishmania braziliensis* e *Bichromomyia flaviscutellata*, comprovado vetor da *Leishmania amazonensis*, ambas agentes de leishmaniose tegumentar.

*Evandromyia evandroi* é, pela primeira vez, assinalada no Estado de Mato Grosso do Sul

---

A presença de uma grande quantidade de machos, além de fêmeas ingurgitadas de *Evandromyia bourrouli* na armadilha de Disney sugere seu hábito rodentofílico.

Concluiu-se que a armadilha de Disney modificada foi a mais eficiente para a captura de *Bichromomyia flaviscutellata*, permitindo constatar a sua dispersão por toda a área de estudo.

A população de *Bichromomyia flaviscutellata* capturada demonstrou comportamento zoofílico, e embora pouca, apresentou atração pelo homem, demonstrando evidências consistentes que permitem incriminá-la como a espécie responsável pela transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na área.

A constatação da infecção pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em dois dos animais sentinelas na armadilha de Disney possibilitaram evidenciar a transmissão natural do parasito.

O pico de captura de *Bichromomyia flaviscutellata* coincidente com o período da infecção natural em hamsters (*Mesocricetus auratus*) sentinelas, permitem supor a existência de um ciclo enzoótico na área, com a infecção acidental e periódica do homem que adentra a área.

---

## REFERÊNCIAS

1. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 269-1281.
2. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull* 1972; 28 (1): 44-48.
3. Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41 (6): 687-725.
4. Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol* 1991; 2: 73-118.
5. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W, Killick-kendrick R (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
6. Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89 (3): 471-478.
7. WHO/OMS. World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis; 2004 fev. 2-4; Geneva; 2004.
8. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-318.
9. Guerin PJ, Oliaro P, Shyam S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 494-500.
10. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366: 1561-1577.
11. Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Malta – an 18-year pediatric population based study. *Arch Dis Childhood* 2000; 82: 381-385.
12. Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral. In: Veronesi R, Focaccia R, eds. *Tratado de Infectologia*. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 1254-1279.
13. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4 (1): 1-24.
14. Dedet JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Ann L'Inst Pasteur* 1993; 4 (1): 3-25.
15. Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. Organizadores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
16. Michalick MSM. Gênero *Leishmania*. In: David Pereira Neves. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 41-46.
17. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-1199.

18. Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: José Rodrigues Coura (ed). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 697-712.
19. Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52 (3): 287-292.
20. Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16: 188-189.
21. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Am Parasitol Hum Comp* 1993; 68: 104-106.
22. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Topley and Wilson's Collier L, Balows, Sussman (eds). *Microbiology and Microbial Infections*. London; 1998. p. 241-266.
23. Grimaldi Jr, G, Tesh, RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6 (3): 230-250.
24. 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.
25. Nogueira LSC, Sampaio RNR. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar Americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An Bras Dermatol* 2001; 76 (1): 51-62.
26. Miranda C, Massa L, Marques CCA. Análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. *Rev Saú Púb* 1996; 30: 433-437.
27. Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. *An Bras Dermatol* 2002; 77: 681-692.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana - Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 – 2005. ["on line"], 28/08/2006, disponível em <http://www.saude.gov.br>
29. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis and leishmanias of the New World, with particular reference to Brazil. *Bull PanAm Heal Org* 1973; 7 (4): 1-19.
30. Costa JML, Vale KC, Cecilia IN, Osaka NKM, Netto EM, Tada MS, França F, Barreto MC, Marsden PD. Aspectos psicossociais e estigmatizantes na leishmaniose cutâneomucosa. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20: 77-82.
31. Magalhães HMTV, Costa JML, Costa RM, França F, Vale KC, Marsden P, Magalhães AV. Mudança no comportamento cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do Sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23 (1): 49-52.

32. Barral A, Sampaio DP, Grimaldi Jr G, Momem H, Pratt DMM, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Netto MB, Carvalho EM, Jonhson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 536-546.
33. Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica* 1999; 72 (3): 251-258.
34. Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In: Peter W, Killick-Kendrick R (eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 291-363.
35. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *J Bras Med* 1992; 63: 82-104.
36. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox, JP Kreir, D Wakelin (eds). *Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Topley & Wilson's, Arnold, Sydney, Auckland; 2005. p. 313-349.
37. Coura JR, Castro GB, Grimaldi Jr G. Disseminated american cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 581-582.
38. Da-Cruz AM, Figueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi Jr G, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 537-542.
39. Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, De Paula CDR. Leishmaniose tegumentar associada à AIDS: relato de quatro casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 651-654.
40. Rocha NMM, Melo MN, Baba EH, Dias M, Michalick MSM, DaCosta 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.
41. De Lima H, De Guglielmo Z, Rodriguez A, Convit J, Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (2): 169-174.
42. 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: 291-296.

43. Thomaz-Soccol V, Castro EA, Luz E, Dereure J, Pratlong F, Membrive N, Dedet JP. *Leishmania* species in two regions of Paraná, Brazil: biochemical characterization by isoenzyme electrophoresis. In: Roussos S, Soccol CR, Pandey A, Augur C. (eds). *New Horizons in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers: Holanda; 2003. p. 429-439.
44. Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An Bras Dermatol* 1992; 67(2): 55-60.
45. Desjeux P. The increase in risk factors for the leishmaniasis Worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-243.
46. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of cutaneous leishmaniasis of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79 (3): 395-396.
47. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad Saú Púb* 1994; 10 (Suppl 2): 359-375.
48. Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa AF; Sousa RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am J Med Hyg* 1994; 50: 693-698.
49. Falqueto A, Coura JR, Coutinho SG, Grimaldi Jr G, Sessa PA, Carias VRD, Claudino JÁ, Aires ATJ. Participação do cão no ciclo da transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 155-163.
50. Talhari S, Talhari AC, Ferreira LCL, Naiff R. Leishmaniose cutâneo-mucosa. In: Talhari S, Neves RG (eds). *Dermatologia Tropical*. MEDSI: São Paulo; 1995. p. 23-45.
51. Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região amazônica do Brasil. *Rev Paraense de Medicina* 1997; 11 (1): 29-40.
52. Sampaio RNR, Paula CDR. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32 (5): 523-528.
53. Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA eds. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press; 1979. p. 1-116.
54. Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 353-359.
55. Souza A, Ishikawa E, Braga R, Silveira F, Lainson R, Shaw JJ. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 112-113.

56. Rangel EF, Lainson R, Souza AA. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) a vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Is it a complex of cryptical species? Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85 (suppl I): 122.
57. Azevedo ACR, Rangel EF, Costa ME, David J, Vasconcelos AW, Lopes UG. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85: 251.
58. Azevedo ACR, Vilela ML, Souza NA, Andrade CAC, Barbosa AF, Firmo ALS, Rangel EF. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 75-79.
59. Passos VMA, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa Santos EGO, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88: 103-110.
60. 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 Saú Púb 1996; 30: 115-128.
61. 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 Paraná state, southern Brazil. An Trop Med Parasitol 2000; 94: 623-631.
62. Meneses CRV, Azevedo ACR, Costa SM, Costa WA, Rangel EF. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Vec Ecol 2002; 27 (2): 207-214.
63. Falqueto A, Sessa P, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 1003-1010.
64. Marcondes CB. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 457-462.
65. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia-Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27: 93-101.
66. Talhari S, Arias JR, Cunha MGS, Naiff RD, Naiff MF, Freitas RA, Barret T. Leishmaniose no Estado do Amazonas. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. An Bras Dermatol 1988; 63 (6): 433-438.
67. Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazonian Region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n. a new parasite from the State of Pará. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 289-292.

68. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, De Souza AA, Ishikawa EA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 735-738.
69. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Carrizales D, Kreutzer RD. *Leishmania (Viannia) lainsoni*, first isolation in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 533-537.
70. Martinez E, Le Pont FA, Mollinedo S, Cupolillo E. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 375-377.
71. Lainson R, Braga RR, Souza AA, Póvoa M, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *An Parasitol Hum Comp* 1989; 64: 200-207.
72. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *An Parasitol Hum Comp* 1989; 64: 3-9.
73. Ryan L, Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ. Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera, Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 547-548.
74. Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará 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.
75. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Lonardon MVC, Dias MLGG, 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 (4): 475-476.
76. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 427-434.
77. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishikawa EAY, 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 Tropica* 2000; 74 (1): 89-93.
78. Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra-Neto A, Galvão CES, Silva CMP, Silva AR. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25: 115-123.
79. Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1994; 36 (5): 459-463.

80. Lainson R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; 18 (1): 47-56.
81. Lainson R Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonian. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 435-443.
82. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. II. Observations on enzootic leishmaniasis in the lower Amazon region – the feeding habits of the vector *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 396-405.
83. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (1): 71-80.
84. Furtado T. Critérios para diagnóstico de LTA. *An Bras Dermatol* 1980; 65: 51-86.
85. Cuba Cuba CA. Diagnostico parasitologico de la leishmaniasis tegumentaria Americana. *Rev Med Exp* 2000; 17: 1-4.
86. Sampaio SAP, Castro RM, Rivitti EA. Leishmaniose Tegumentar Americana e outras dermatoses zooparasitárias. In: *Dermatologia Básica*. São Paulo: Artes Médicas; 1983. p. 373-377.
87. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Med Hyg* 1975; 69: 323-335.
88. Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá, RJ. Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1980; 22: 149-155.
89. Guedes ACM, Cucé LC, Furtado T. Avaliação imunológica e histopatológica da reação de Montenegro. *An Bras Dermatol* 1990; 65 (5): 34-40.
90. 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: 347-355.
91. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21: 123-152.
92. Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abah FGC. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diag Lab Immunol* 2000; 7(2): 318-321.
93. Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do hospital-escola da UnB. *An Bras Dermatol* 1980; 55: 69-76.

94. Souza WJS, Coutinho SG, Marzochi MCA, Toledo LM, Gottlieb MV. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1982; 77: 247- 253.
95. Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 1999; 37: 1819-1823.
96. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89 (3): 463-469.
97. Loureiro CCP, Dadalti P, Gutierrez MCG, Ramos e Silva M. Leishmaniose: métodos diagnósticos. Folha Med 1998; 117 (2): 131-134.
98. Hennig W. Insektenfossilien aus der unteren Keide. IV. Psychodidae (Phlebotominae), mit einer kritischen übersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien (Diptera). Stutt Beitr Naturkunde 1972; 241: 1-69.
99. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R, eds. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 207-255.
100. Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, 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): 283-296.
101. Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Patol Trop 2003b; 32 (2): 235-261.
102. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colômbia. J Med Entomol 1993; 30 (2): 427-435.
103. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. Clin Dermatol 1999; 17: 279-289.
104. Forattini OP. Edgar Blücher. Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo; 1973. 658p.
105. Brazil RP, Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF, Lainson R. Organizadores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 257-274.
106. Gontijo CMF, Coelho MV, Falcão AL. The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82 (3): 445.
107. Santos da Silva O, Grünwald J. Natural haematophagy of male *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). Med Vet Entomol 1999; 13 (4): 465-6.

108. Gomes AC, Barata JMS, Rocha e Silva EO, Galati EAB. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Med trop São Paulo 1989; 31 (1): 32-9.
109. Sergent ED, Sergente ET, Lemaire G, Senevet G. Hypothèse sur le phlebotome transmetteur et la tarente reservoir du virus du bouton du Orient. Ann Inst Pasteur Algérie 1915; 29: 309-322.
110. Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Métodos de Captura, Conservacion y Montaje de los Febotomos (Diptera: Psychodidae). OPS/HCP/HCT/95/97; 1997. 72p.
111. Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Povia MM, Lima JAN, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 1251-1259.
112. Naiff RD, Barret TV, Freitas RA. Isolation of *Trypanosoma freitasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Psychodopygus clautrei* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 273-275.
113. Shaw JJ, Rosa AT, Souza A, Cruz AC. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 337-351.
114. Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniosis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82 (1): 119-124.
115. Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998; 12: 315-317.
116. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 229-243.
117. 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): 655-664.
118. Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in northeast Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 488-494.
119. Kawa H, Sabroza PC. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. Cad Saú Púb 2002; 18(3): 853-865.
120. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral Americana. Brasília; 2000.

121. Lucciola GV, Passos VMA, Patrus AO. Mudança no padrão epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 1996; 71 (2): 99-105.
122. Rangel EF. Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in peridomestic foci in State of Rio de Janeiro and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region. *Tropical Disease, Society and Environment Conference Reports* 1995; 2: 103-110.
123. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CENEPI). Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil. Brasília, 2002.
124. Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Planejamento de Ciência e Tecnologia. Campo Grande; 2000.
125. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Produção Extrativa Vegetal. Rio de Janeiro; 2002.
126. 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.
127. Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Aão 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: 185-193.
128. Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Superintendência de Epidemiologia e Vigilância em Saúde. Relatório de Notificação de Leishmanioses. Campo Grande; 2006.
129. Migone LE. Un caso de Kalazar a Assuncion (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot* 1913; 6: 118-120.
130. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro; 1956. 162p.
131. Chagas E, Chagas AW. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral Americana em Mato Grosso. *Hospital* 1938; 13: 471-480.
132. Oliveira AC. Um caso de leishmaniose visceral americana. *Hospital* 1938; 13: 465-470.
133. Arruda W, Costa FC, Nahas S, Rosenfeld G. Leishmaniose Visceral Americana. *Brasil-Med.* 1949; 63: 64-65.
134. Nunes VLB, Yamamoto YY, Rego Júnior FA, 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(1/2): 17-21.
135. Yamamoto YI, Nunes VLB, Rego Jr FA, 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: 143-152.

136. Mello DA, Rego-JR FA, Oshiro E, Nunes VL. *Cerdocyon thous* (L.) (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 (2): 259.
137. Galati EAB, Nunes VL, Rego-JR FA, Oshiro ET, Rodrigues M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saú Pú 1997; 31(4):378-90.
138. Santos SO, Arias JR, Hoffmann MP, 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*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (5) : 633-634.
139. Cortada VMCL, Doval MEC, Souza Lima MAA, Oshiro ET, Meneses CRV, Abreu-Silva AL, Cupolilo E, Souza CSF, Cardoso FO, Valle TZ, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Res Comm 2004; 28: 365-74.
140. Nunes VLB. Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998, 1999. São Paulo; 2001. Doutorado [Tese de Doutorado em Saúde Pública]. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo.
141. Savani ESMM. Aspectos da transmissão de leishmanioses no Assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002-03. Infecção natural em animais domésticos e vetores. São Paulo; 2004. Doutorado [Saúde Pública]. Faculdade de Saúde Publica. Universidade de São Paulo.
142. Silva ES, Carvalho FG, Silva EA, Fiozi E, Oliveira AG, Brazil RP. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Res Congr Bras Med Trop 2000; São Luís.
143. Oliveira ALL. Estudos Clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005. Rio de Janeiro; 2006. Doutorado [Medicina Tropical]. Instituto Oswaldo Cruz.
144. Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Cad. Saú Pú 2003;19: 933-944.
145. Campo Grande. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Secretaria de Saúde de Campo Grande. Serviço de Vigilância Epidemiológica. Relatório de Notificações de LV. 2006. Campo Grande.
146. Faria AC, Castro LLC. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar no MS entre 1984-1993. In: Anais 5º Encontro de Iniciação Científica. Goiânia. CNPq/UCDB/UCG/UFG/UFMS/UFU; 1996.

147. Noguchi RC. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo de casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante o período de 1976 a 1999. Campo Grande; 2001. Mestrado [Mestrado Interinstitucional em Medicina Tropical]- Instituto Oswaldo Cruz.
148. Bela Vista. Secretaria Municipal de Saúde. Plano Municipal de Saúde de Bela Vista 1997 a 2001. Bela Vista; 2001.
149. Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrel ed. World Class Parasites: Leishmania. Kluwer Academic Publishe. London; 2002. p. 11-31.
150. Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev Bras Epid 2004; 7 (3): 328-337.
151. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil- A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99 (3): 239-251.
152. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62: 385-395.
153. Lainson R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 377-387.
154. Brandão-Filho SP, Brito MEF, Martins CAP, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, Gomes J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31: 575-578.
155. Onety AC, Santos FGC, Paes MG, Coelho LIARC, Santos SL, Onety DC, Talhari S, Guerra JAO. Treinamentos militares em áreas de selva na Amazônia e sua relação com a leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35 (1): 526.
156. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar Americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (5): 587- 590.
157. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). Trans R Soc Trop Med Hyg 1972; 66: 709-717.
158. Arias JR, Freitas RA. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. Acta Amazonica 1982; 12 (3): 599-608.
159. Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 2000; 14: 109-122.

160. Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. *Am J Trop Med Hyg* 1939; 19: 131-140.
161. Perez JE, Villaseca A, Llanos-Cuenta A, Campos M, Guerra H. Técnicas para coletar "titiras" (*Lutzomyia* spp., Diptera: Psychodidae), en ambientes altoandinos peruanos. *Rev Peru Ent* 1988; 30: 77-80.
162. 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(5): 641-647.
163. Martins AV, Falcão AL, Williams P. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1978. 195p.
164. Martins F, Silva IG, Bezerra WA, Maciel JM, Silva HHG, Lima CG, Cantuária PB, Ramos OS, Ribeiro JB, Santos AS. Diversidade e frequência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. *Rev Patol Trop* 2002; 31: 211-224.
165. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 427-432.
166. Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG, Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 305-322.
167. Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares, no Estado de São Paulo. *Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo* 1953; 7: 158-167.
168. Hashiguchi Y, Chiller T, Inchausti A, Arias A, Kawabata M, Alexander JB. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *An Trop Med Parasitol* 1992; 86: 175-180.
169. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes CB. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic Forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *An Trop Med Parasitol* 2005; 99(7): 683-693.
170. Comer JA, Tesh RB, Modi GB, Corn JL, Nettles VF. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 483- 490.
171. Franco AMR, Grimaldi G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 261-268.
172. Rowton E, Mata M, Rizzo N, Navin T, Porter C. Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parassitologia* 1991; 33(Suppl. 1): 501-504.

173. Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci* 2002; 72(1): 83-86.
174. Dias-Lima AG, Guedes MLS, Sherlock IA. Horizontal stratification of sandfly (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain Forest, state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 733-737.
175. Leonardo FS, Rebêlo JMM. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 282-284.
176. Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa A, Souza AA. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis* aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 524-529.
177. Disney RHL. A trap for phlebotomine sand flies attracted to rats. *Bull Entomol Res* 1966; 56: 445- 451.
178. Ward R, Lainson R, Shaw JJ. Further evidence of the role of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *Trans R Soc Med Hyg* 1973; 67: 608-609.
179. Ready PD, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of “enzootic rodent leishmaniasis” (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of “pian –bois” (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forest in eastern Amazônia. *Trans R Soc Med Hyg* 1983; 77(5): 775-785.
180. Campbell-Lendrum DH, Pinto MC, Brandão-Filho SP, De Souza AA, Ready PD, Davies RC. Experimental comparison of anthrophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol* 1999; 13: 299-309.
181. Ryan L, Lainson R, Shaw JJ, Neto HF. Ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na região Amazônica. Instituto Evandro Chagas. Belém; 1986. p. 307-315.
182. Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo ANC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 43-46.

## **ANEXO**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº. 109/2006 referente ao projeto de pesquisa **“Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose tegumentar em área militar no Município de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2004-2006”**, de responsabilidade da Pesquisadora **Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 21 de março de 2006.

Campo Grande (MS), 21 de março de 2006.

  
Profª Joice Stein

Vice- Presidente da CEUA