



## Artigo/Article

# Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil

Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil

Érika Monteiro Michalsky<sup>1</sup>, Karla de Sena Guedes<sup>1</sup>, Fabiana de Oliveira Lara e Silva<sup>1</sup>, João Carlos França-Silva<sup>2</sup>, Consuelo Latorre Fortes Dias<sup>3</sup>, Ricardo Andrade Barata<sup>4</sup> e Edelberto Santos Dias<sup>1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** A leishmaniose visceral tem sido notificada em quase todos os estados do Brasil, e principalmente no norte de Minas Gerais, onde a doença é endêmica. Este estudo visou detectar a infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* e identificar através da técnica de PCR/RFLP a espécie de *Leishmania* encontrada nos flebotomíneos do município de Janaúba. **Métodos:** Utilizando-se armadilhas luminosas, foram capturadas 1.550 fêmeas de *L. longipalpis*, que agrupadas em pool de 10 exemplares foram submetidas à extração e amplificação de DNA, através das técnicas de PCR genérico e cacofonia. **Resultados:** Dos 155 pools, seis apresentaram-se positivos para *Leishmania* sp., sendo a taxa de infecção do município de 3,9%. Através da PCR/RFLP determinou-se que o padrão de digestão das amostras positivas foi semelhante ao da cepa referência *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **Conclusões:** A detecção de infecção natural associada a estudos sobre a epidemiologia da LV sugere que *L. longipalpis* esteja envolvida na transmissão de *L. infantum chagasi* em Janaúba, principalmente nas áreas de intensa transmissão de LV.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose visceral. Infecção natural. *Lutzomyia longipalpis*. *Leishmania infantum chagasi*.

### ABSTRACT

**Introduction:** Visceral leishmaniasis has been notified in nearly all states of Brazil, and particularly in the north of Minas Gerais, where the disease is endemic. The aim of this study was to detect natural infection of *Lutzomyia longipalpis* and, through the PCR/RFLP technique, identify *Leishmania* species found in sandflies in the municipality of Janaúba. **Methods:** Using light traps, 1,550 females of *L. longipalpis* were caught and grouped into pools of 10 specimens to be subjected to DNA extraction and amplification, by means of generic PCR and cacophony. **Results:** Out of the 155 pools, six were positive for *Leishmania* sp., and thus the infection rate in the municipality was 3.9%. Through PCR/RFLP, the digestion pattern among the positive samples was found to be similar to that of the reference strain of *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **Conclusions:** The detection of natural infection associated with studies on the epidemiology of visceral leishmaniasis suggests that *L. longipalpis* is involved in transmission of *L. infantum chagasi* in Janaúba, particularly in areas of intense transmission of visceral leishmaniasis.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis. Natural infection. *Lutzomyia longipalpis*. *Leishmania infantum chagasi*.

1. Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG. 2. Departamento de Parasitologia, Laboratório de Leishmanioses e Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 3. Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Serviço de Biologia Molecular I, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. 4. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. **Endereço para correspondência:** Dr. Edelberto Santos Dias. Lab. Leishmanioses/CPqRR/FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG.

Tel: 55 31 3349-7758

e-mail: edel@cpqrr.fiocruz.br

Recebido para publicação em 14/07/2010

Aceito em 16/09/2010

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença crônica grave, causada por espécies de *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*<sup>1</sup>. No Brasil, o agente etiológico *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), é transmitido ao homem através da picada de fêmeas da espécie *L. (L.) longipalpis* (Lutz & Neiva 1912).

A leishmaniose visceral encontra-se atualmente entre as sete endemias consideradas prioritárias no Mundo<sup>2</sup>. Nos últimos anos, a doença vem se tornando um importante problema de saúde pública, estando amplamente distribuída nos quatro continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oriente Médio, sul da Europa, norte da África, América do Sul e Central. Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que cerca de 97% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil<sup>3</sup>.

O diagnóstico da LV pode ser feito através de métodos clássicos juntamente com evidências clínicas e epidemiológicas. No campo laboratorial, além dos exames parasitológicos de rotina e da avaliação da resposta sorológica, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem se mostrado um instrumento de grande sensibilidade no diagnóstico da LV através da pesquisa do DNA do parasita em materiais biológicos diversos<sup>2,4-10</sup>. A utilização da técnica de PCR na detecção do DNA de *Leishmania* iniciou-se em 1990, tendo como alvo as moléculas de minicírculos do parasita<sup>11</sup>. Esses autores demonstraram a sensibilidade do método capaz de detectar uma única forma amastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e até 1% do kDNA (ácido desoxirribonucléico de cinetoplasto) de uma amastigota de *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

Além dos estudos clínicos, a PCR tem sido uma ferramenta eficiente em estudos epidemiológicos,

na tentativa de incriminar animais silvestres e domésticos como hospedeiros ou reservatórios da doença, além de detectar a presença do parasito em flebotomíneos, sejam eles infectados experimentalmente, através de xenodiagnóstico ou infecção artificial e, também, em condições naturais. Esta técnica tem sido aplicada para analisar as diversas amostras destes insetos provenientes do campo, tendo em vista a dificuldade na detecção, identificação e caracterização dos organismos infectantes pelos métodos convencionais<sup>12-16</sup>.

Nos últimos anos, foi demonstrado que a PCR/RFLP (*polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism*) é capaz de diferenciar *L. (Leishmania) amazonensis* de *L. braziliensis* em seres humanos infectados<sup>2</sup>. A mesma técnica pode também diferenciar *L. amazonensis* e *L. braziliensis* de *L. chagasi*. Em áreas endêmicas de LV e LTA, onde *L. chagasi* e *L. braziliensis* são simpátricas, é importante dispor de testes de diagnóstico não só para confirmar a presença do parasito em seus hospedeiros (homem e cão), mas também identificar e distinguir as espécies circulantes de *Leishmania*<sup>2</sup> naquelas regiões.

O objetivo deste estudo foi detectar a infecção natural de *L. longipalpis* por *Leishmania* sp. em flebotomíneos infectados capturados no município de Janaúba, Minas Gerais.

## MÉTODOS

### Área de estudo

O Município de Janaúba localiza-se na mesorregião norte do Estado de Minas Gerais, na área do semiárido e na microrregião da Serra Geral de Minas, da qual é a cidade pólo. A área do município é de aproximadamente 2.260km<sup>2</sup> e está a 516m de altitude, tendo sua posição determinada pelas seguintes coordenadas geográficas: 15°47'50" de latitude sul e 43°18'31" de longitude oeste.

### Captura de flebotomíneos

As capturas de flebotomíneos foram realizadas em 15 residências do município de Janaúba. Para as coletas, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo HP (*Hoover Pugador*), instaladas no peridomicílio dos bairros em estudo. Foram incluídos bairros de transmissão esporádica, moderada e intensa para LV de acordo com os critérios adotados pelo Ministério da Saúde<sup>17</sup>. Essas foram realizadas sempre na primeira semana de cada mês, ininterruptamente, durante duas noites consecutivas no período de 12 meses (abril/2006 a março/2007).

As fêmeas capturadas foram acondicionadas em dimetilsulfóxido (DMSO 6%) e armazenadas em nitrogênio líquido. Essas foram dissecadas para determinação da espécie (*L. longipalpis*) e utilizadas em *pool* de 10 flebotomíneos para detecção da infecção através das seguintes técnicas: PCR genérico, gene da cacofonia e PCR-RFLP.

### PCR de gene constitutivo específico de flebotomíneo (cacofonia)

Para a detecção do gene constitutivo do DNA de flebotomíneos (cacofonia) foi utilizado um par de iniciadores específicos da região IVS6 de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*<sup>18</sup>: 5Llcac 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 3Llcac 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'. As reações foram preparadas para volume final de 25µl. A mistura para a reação foi feita utilizando kit para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA polymerase, 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dATP, dCTP, dGTP and dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada pérola foram adicionados 2µl de cada primer a 200ng cada e

19µl de água ultrapura. Em seguida, foram adicionados a estes 2µl de DNA na concentração foi de 10ng/µl. A amplificação do DNA foi realizada em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneAmpPCRSytem 2400). O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 12min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s e uma extensão final a 72°C por 10min. A cada conjunto de reações de PCR foi sempre incluídos um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (DNA purificado de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*).

Após amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e impregnação por nitrato de prata.

A taxa de infecção natural foi expressa como taxa mínima de infecção (TMI), calculada dividindo-se o número de grupos positivos pelo número total de espécimens testados x 100<sup>19</sup>.

### Detecção de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos infectados naturalmente através da PCR

As fêmeas dissecadas e identificadas foram transferidas em *pool* de 10 para microtubos de fundo cônico e submetidas à extração de DNA. A extração de DNA foi realizada através da técnica fenol-clorofórmio. As amostras foram maceradas a seco (sob gelo), adicionados 50µl de tampão de lise (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0), 1,0µl de solução aquosa de Proteinase K (10mg/mL) e incubadas a 37°C *overnight*. Posteriormente, foram adicionados 70µl de água ultrapura e 120µl de fenol saturado em tampão. Em seguida, foi feito o tratamento com 120µl de clorofórmio: isoamílico (24:1) e o DNA foi precipitado a -20°C *overnight*, adicionando-se 20µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200µl de etanol absoluto gelado. O precipitado foi lavado com 100µl de etanol 70% gelado. O DNA foi ressuspendido em 100µl de TE 1x e armazenado a -20°C.

A concentração e o grau de pureza do DNA foram estimados por leitura em espectrofotômetro (Nano Drop) em 260nm e 280nm.

Para detectar a infecção, foi utilizada a PCR que amplifica a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*<sup>20</sup>, utilizando-se os seguintes primers: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', 5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' como descrito acima para a técnica de PCR cacofonia.

A amplificação do kDNA foi realizada em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneAmpPCRSytem 2400). O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 4min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s e uma extensão final a 72°C por 10min<sup>7</sup>.

A cada conjunto de reações, foram incluídos um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (DNA purificado da cepa referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903)).

Após amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e impregnação por nitrato de prata.

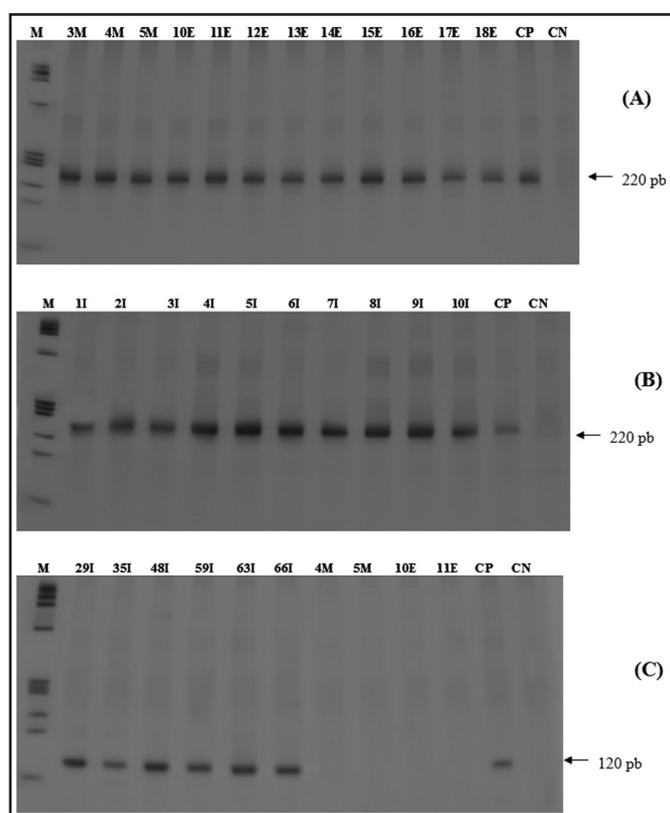
### PCR-RFLP KDNA

PCR-RFLP KDNA foi realizada nas amostras positivas<sup>2</sup>. Três microlitros do produto amplificado foram digeridos por adição de 0,1µl de *Hae* III 4,000U/ul e 1,0µl de tampão 10x concentrado (Amersham Biosciences), juntamente com 5,9µl de água ultrapura. A mistura foi incubada por 3h a 37°C e os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10% impregnados por prata. Os fragmentos gerados foram comparados às amostras referência de *L. amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2930) e *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

## RESULTADOS

Através da análise de cacofonia (gene constitutivo do DNA de flebotomíneos), todas as 155 amostras testadas mostraram-se positivas, validando tanto a extração de DNA como os resultados negativos. As **Figuras 1A e 1B** exemplificam resultados típicos obtidos.

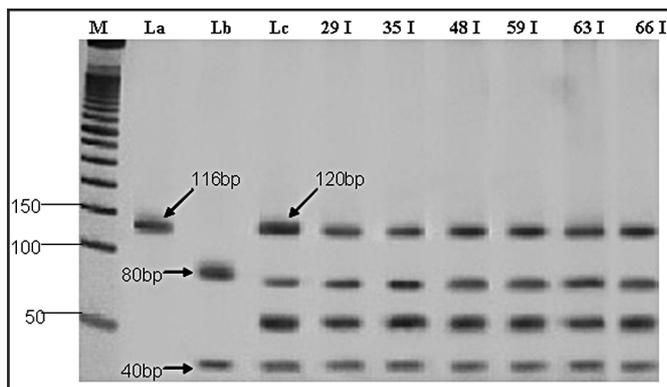
Das 155 amostras analisadas, 50 eram de área esporádica, seis da área moderada e 99 da área intensa de transmissão de LV. O fragmento de 120pb característico de *Leishmania* sp foi observado em 6 dos 99 *pools* de amostras da área intensa, não tendo sido detectada qualquer amostra positiva para os exemplares provenientes de áreas moderada e esporádica (**Figura 1C**). A taxa mínima de infecção calculada para Janaúba foi de 3,9%.



**FIGURA 1** - Eletroforese em gel de acrilamida a 6% impregnado por prata. **A e B**) Produtos de amplificação (*Lutzomyia longipalpis*) obtidos com iniciadores o gene da cacofonia IV56 para *Lutzomyia*. **C**) Produtos de amplificação (*Lutzomyia longipalpis*) obtidos com iniciadores genéricos para *Leishmania*.

M: marcador de peso molecular  $\varnothing$ X174 *Hae III*; amostras de flebotomíneos provenientes de área de transmissão intensa, moderada e esporádica de LV estão identificadas pelos números, CP: controle positivo da reação: A e B (DNA de *Lutzomyia longipalpis*), e C: (DNA purificado de *L. brasiliensis* (MHOM/BR/75/2903), CN: controle negativo da reação (sem DNA).

A PCR/RFLP foi realizada nas 6 amostras positivas para *Leishmania* sp. Comparando-se os fragmentos de DNA gerados pela digestão dos produtos amplificados com os fragmentos de cepas de *Leishmania* de referência, observou-se que as amostras identificadas acompanharam o padrão de *L. chagasi*, conforme descrito na **Figura 2**.



**FIGURA 2** - Eletroforese em gel de acrilamida a 10% impregnado por prata. Perfis de bandas gerados após a digestão do produto amplificado utilizando a enzima *Hae III* na PCR-RFLP.

M: marcador de peso molecular 50pb, cepas de referência: La: *Leishmania amazonensis*, Lb: *Leishmania braziliensis*, Lc: *Leishmania chagasi*, amostras positivas de flebotomíneos provenientes de área de transmissão intensa de LV estão identificadas pelos números.

## DISCUSSÃO

O município de Janaúba, localizado ao norte do Estado de Minas Gerais, parece ilustrar o processo de expansão e urbanização da LV. Este foi recentemente caracterizado pelo Ministério da Saúde como área de intensa transmissão de LV, apresentando um número crescente de casos humanos notificados, aproximadamente 119 casos, nos últimos 5 anos ( $\geq 4,4$  casos/5 anos)<sup>17</sup>, mas além de áreas de transmissão intensa, o município apresenta áreas de transmissão moderada e esporádica.

Os 15 bairros (transmissão moderada, esporádica e intensa) onde foram realizadas as capturas entomológicas para detecção de infecção natural, não apresentavam características diferenciais marcantes, em sua maioria eram extremamente pobres, com deficiência na coleta de lixo e de saneamento básico, sendo que em algumas áreas muitos moradores possuem baixos índices socioeconômicos, a convivência com animais domésticos é bastante elevada, há presença de área sombreada, resultando em acúmulo de matéria orgânica e proporcionando assim condições favoráveis para a ocorrência da presença do vetor e transmissão da doença.

O crescimento não planejado da área urbana de Janaúba, assim como ocorrido em diversas cidades do Brasil, em outros municípios do norte de Minas Gerais, como Porteirinha, Montes Claros, Varzelândia, tem papel fundamental no desenvolvimento de agravos da saúde<sup>21-23</sup>. Este crescimento desordenado implica em uma série de transformações do meio ambiente e possibilita a instalação e expansão das leishmanioses, principalmente da LV, no município.

É conhecido que existe uma correlação entre a densidade de *L. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie de flebotomíneo é frequentemente associada à presença de animais domésticos. A presença de *L. longipalpis* no meio urbano se deve principalmente à sua alta adaptabilidade ao ambiente modificado pelo homem, o que lhe confere um papel importante na epidemiologia da leishmaniose visceral. Esta espécie tem ampla distribuição geográfica ao longo do país, que em geral, coincide com a da LV<sup>24-26</sup>.

A detecção de infecção natural em fêmeas de *L. longipalpis* em áreas endêmicas de LV, tem papel fundamental no envolvimento desta espécie na transmissão da LV nestas áreas. A soma destes fatores

associados aos diversos estudos que incriminam esta espécie como transmissora da *L. infantum chagasi*, aumentam as evidências da participação desta espécie no ciclo epidemiológico da LV<sup>5,14,16,27</sup>.

O método mais comumente utilizado na pesquisa de infecção natural é a dissecação, que é muito trabalhoso e consome muito tempo na pesquisa pelo parasito em loco, requerendo prática e habilidade na execução. Além disto, a confirmação dos casos positivos precisa ser feita através da cultura *in vitro* de *Leishmania*, frequentemente suscetível à contaminação ou ainda através da inoculação em animais de laboratório, pois outros flagelados são encontrados no trato digestivo destes insetos<sup>26,28</sup>.

A amplificação de DNA através da PCR constitui-se em uma alternativa prática e vantajosa, por ser um método altamente sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania* spp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados<sup>7,13,29,30</sup>. As principais vantagens deste método molecular são sua sensibilidade e especificidade, que são pouco dependentes do número, estágio e localização dos parasitos no trato digestivo do inseto<sup>9</sup>.

É extremamente importante identificar as espécies de *Leishmania* que circulam em um determinado foco de transmissão, principalmente quando o alvo é a epidemiologia da doença. Sabe-se que o agente etiológico responsável pela LV no novo mundo é a *L. infantum chagasi*, porém diversas regiões do Brasil são endêmicas para leishmaniose tegumentar (LT) e LV<sup>31</sup>. Portanto, neste trabalho utilizamos a PCR/RFLP<sup>2</sup> para determinar a espécie de *Leishmania* encontrada em fêmeas de flebotomíneos infectados do município de Janaúba, já que este apresenta casos humanos de LV e LT.

A contaminação pôde ser evitada e acompanhada através da utilização de rígidos controles negativos, e controle interno a partir da utilização de iniciadores para amplificar o gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos para a certificação da extração de DNA e confirmação dos resultados negativos<sup>18</sup>.

Neste estudo, foi possível detectar a infecção de fêmeas de *L. longipalpis* por *L. infantum chagasi* pela primeira vez no município de Janaúba, ficando a taxa de infecção natural do município em 3,9%.

Sabemos que a taxa de infecção de *Leishmania* no vetor é considerada baixa na natureza, mesmo em áreas endêmicas para LV, mas baseado no alto grau de antropofilia e capacidade vetorial de *L. longipalpis*, no registro de casos autóctones de LV e na abundância e distribuição espacial desta espécie coincidente com a área de ocorrência da doença, podemos sugerir sua participação no ciclo de transmissão da LV no município.

A detecção de flebotomíneos infectados naturalmente ter ocorrido somente em 2 bairros de intensa transmissão (Saudade e Padre Eustáquio), não teve relação direta com a densidade populacional e taxa de prevalência canina alta. Como por exemplo, o bairro Algodões (transmissão esporádica), sem ocorrência de casos humanos, sem presença de vetor infectado naturalmente, prevalência canina de 10% e elevada densidade populacional de flebotomíneos capturados<sup>32</sup>, como também outros bairros de transmissão moderada e intensa não apresentaram flebotomíneos infectados naturalmente, mas apresentava tanto prevalência canina alta (> 20%), quanto densidade populacional elevada. Portanto, a infecção natural ter ocorrido somente em bairros de transmissão intensa foi ocasional, sendo necessários estudos relacionados com outros possíveis vetores da LV.

Através desses resultados, pode-se inferir que a utilização da PCR na detecção de flebotomíneos infectados naturalmente,

parece superar em grande parte os problemas encontrados nos métodos de dissecação de flebotomíneos, como baixa sensibilidade e especificidade na detecção e identificação do parasito. Portanto, essas qualidades aliadas à confirmação parasitológica através da detecção de infecção natural pelo PCR genérico e até mesmo da espécie de *Leishmania* circulante no vetor pela PCR/RFLP, exercem um papel fundamental em estudos epidemiológicos, permitindo um melhor entendimento da relação entre o vetor, o agente etiológico e seus reservatórios na transmissão da LV no município de Janaúba.

## AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Setor de Vigilância e Fatores Ambientais da Secretaria Municipal de Saúde de Janaúba, pela colaboração nas capturas e também pelo apoio logístico e aos moradores do município pela cooperação.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## SUORTE FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Fundação Oswaldo Cruz.

## REFERÊNCIAS

1. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81:517.
2. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha A. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90:31-37.
3. World Health Organization [internet]. Leishmaniasis; 2007. [Acesso abril 2007]. Disponível em <http://www.who.int/>.
4. Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. *Ve Parasitol* 2006; 140:231-238.
5. Dutra-e-Silva JG, Werneck GL, Pires-e-Cruz MS, Costa CHN, Mendonça IV. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cad Saude Publica* 2007; 23:1715-1720.
6. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:87-93.
7. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* sp. em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44:255-259.
8. Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafrente RS, Andrade Jr HF. Single step Polymerase Chain Reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004; 46:335-338.
9. Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:161-164.
10. Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:795-803.

11. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71:267-275.
12. Martín-Sánchez J, Gállego M, Báron S, Castillejo S, Morillas-Marquez F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sad flies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:527-532.
13. Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 2007; 147:67-76.
14. Nascimento JC, Paiva BR, Malforte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:119-122.
15. Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia Maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:540-543.
16. Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitol* 2008; 119:43-348.
17. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2003.
18. Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol* 2002; 11:117-122.
19. Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 2006; 99:252-259.
20. Degrave W, Barker JRR, Badaro RH, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 58:251-255.
21. Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, de Paula EV, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:481-487.
22. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Gonçalves CM, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:1-4.
23. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:147-152.
24. Galati E. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. p. 23-206.
25. Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodiade) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:913-918.
26. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2246-2252.
27. Flórez M, Martínez JP, Gutiérrez R, Luna KP, Serrano VH, Ferro C, et al. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) em um foco suburbano de leishmanioses visceral em el Cãnon Del Chicamocha em Santander, Colômbia. *Biomedica* 2006; 26:109-120.
28. Tesh RB, Modi GB. A simple method for experimental infection of phlebotomine sandflies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:41-46.
29. Muller N, Zimmermann V, Foster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 2003; 114:223-229.
30. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99:905-913.
31. Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002; 7:641-651.
32. Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara-e-Silva FO, Loureiro AM, Fortes-Dias CL, et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:56-61.