

Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911

Study of the vectorial competence of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) to *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911

Antonio Carlos da Silva¹ e Almério de Castro Gomes²

Resumo Estudou-se a competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae) do Vale do Ribeira (SP) para estirpes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), mediante pesquisa de infectividade natural; exposições de fêmeas silvestres e colonizadas (F1) às lesões de hamsters experimentalmente infectados e testes de transmissão via picada. A infectividade natural e os testes de transmissão revelaram-se negativos e, nas exposições, foram obtidas positivities de 74% (123+/166 dissecados) e 70% (115+/164 dissecados) para fêmeas silvestres e colonizadas respectivamente, e o desenvolvimento das formas evolutivas compatíveis com o modelo *Peripilaria*. A suscetibilidade às estirpes testadas associada aos indicadores epidemiológicos concorrem para a suspeita do papel vetorial de *Lutzomyia intermedia* na região estudada.

Palavras-chaves: *Lutzomyia intermedia*. *Leishmania (V.) braziliensis*. Competência vetorial.

Abstract This paper investigated the vectorial competence of *Lutzomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae) in Vale do Ribeira (SP) to strains of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), by means of a search for natural infection; exposure of wild and colonized females (F1) to the lesions of experimentally infected hamsters and transmission tests by bite. The natural infection and the transmission tests were negative. In the exposures of *Lu. intermedia* to infected lesions we found rates of 74% (123+/166 dissected) and 70% (115+/164 dissected) for the wild and colonized females respectively. The development of the parasites was compatible with the development model of *Peripilaria*. The susceptibility of the tested strains associated with the epidemiological indicators contribute to the vectorial role suspicion of *Lutzomyia intermedia* in the studied region.

Key-words: *Lutzomyia intermedia*. *Leishmania (V.) braziliensis*. Vectorial competence.

O papel biológico dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses e bartonelose há muito foi estabelecido¹⁻¹⁹. Entretanto, estudos de competência vetorial para a *Leishmania (Viannia) braziliensis* ainda são escassos, considerando sua ampla distribuição geográfica nas Américas²³⁻³⁴.

A região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, foi indene durante décadas, até mesmo nos períodos de maiores desflorestamentos¹⁵, ainda que ciclos naturais deste parasito transcorresse dentro das florestas¹⁷. Contudo, a alteração para área endêmica foi recente e coincide com o aparecimento de *Lu. intermedia* no ambiente domiciliar situado em zona rural¹⁴. A partir

desta observação desenvolveram-se estudos para certificar a modalidade de transmissão predominante para *L. (V.) braziliensis*, tendo como suspeita o envolvimento de *Lu. intermedia* tanto para humanos quanto para animais domésticos. Esta hipótese também se baseou no encontro natural desse flebotomíneo com *Le. braziliensis* na região do planalto paulista¹³.

Neste contexto, os resultados dos estudos envolvendo os determinantes da LTA na região²⁻¹²⁻¹⁸, somados àqueles de caráter biológico e ecológico da fauna flebotomínea onde verificou-se coincidência de ocorrência flebotomíneo/casos humanos no ambiente domiciliar¹⁸ ou uma densidade longitudinal flutuante

1. Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Alfenas, MG; 2. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Apoio financeiro: Trabalho realizado com auxílio financeiro de CAPES e CNPq

Endereço para correspondência: Dr. Antonio Carlos da Silva. Depto. de Análises Clínicas/EFOA. R. Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000 Alfenas, MG, Brasil. Tel: 55 35 3299-1221; Fax: 55 35 3299-1063

e-mail: carlcsilva@int.efoa.br

Recebido para publicação em 16/7/1999.

diretamente proporcional aos índices de incidência da doença¹⁶, corroboraram com a determinação da capacidade vetorial, concordando-se assim com a possibilidade de *Lu. intermedia* ser responsabilizado pela veiculação daquele parasito. Assim sendo, a maioria das características ecológicas acumuladas apontou para essa incriminação,

apesar das dificuldades para encontrar esse flebotomíneo naturalmente infectado.

Face a isso, este estudo teve por objetivo investigar a infectividade natural e suscetibilidade experimental, para aclarar a competência vetorial da população de *Lu. intermedia* do Vale do Ribeira, ampliando-a às estirpes de *Le. braziliensis* originárias da região Amazônica e Vale do Ribeira.

MATERIAL E MÉTODOS

A área estudada pertence aos municípios de Miracatu/Pedro de Toledo, situados na região do Vale do Ribeira (SP) a 24°09' de latitude sul e 47°17' de longitude oeste, nos bairros denominados Pedra do Largo (Distrito Santa Rita) e São Lourençinho.

Coleta dos insetos. As capturas dos flebotomíneos foram realizadas durante os anos de 1994 a 1998, em orla e interior de mata, domicílios e periodomicílios, utilizando-se da armadilha de Shannon³³ e capturador de Castro⁵, em horário entre 19 e 24 horas. Estes exemplares eram transportados ao laboratório em gaiolas apropriadas e, posteriormente, selecionados para as colônias de criação³⁰ e grupos experimentais.

Leishmania (V.) braziliensis. Foram utilizadas as estirpes MHOM/BR/75/M2903 da região Amazônica e MCAN/BR/82/VR7312 do Vale do Ribeira.

Grupos experimentais. Grupo A. Pesquisa de infecção natural: 5.291 fêmeas ingurgitadas, ou com ovos, foram dissecadas segundo técnica de Johnson e colaboradores²² para reconhecimento da espécie mediante aspecto morfológico da espermateca¹⁰ e pesquisa de flagelados no tubo digestivo.

Grupo B. Teste de suscetibilidade com *Lu. intermedia* silvestres: a uma amostra de 100 exemplares fêmeas foram servidos, uma única vez, hamsters experimentalmente infectados com *Le. braziliensis*, à temperatura de 25°C e umidade relativa de 85%. Após 7 dias do ingurgitamento foram dissecadas à semelhança do grupo A.

Grupo C. Teste de suscetibilidade com *Lu. intermedia* colonizadas: a uma amostra de 100 exemplares fêmeas de 1ª geração²¹ com 2 a 3 dias de idade, em jejum, foram servidos hamsters experimentalmente infectados por *Le. braziliensis*. Após 7 dias, 50% dos exemplares ingurgitados foram dissecados para a pesquisa de promastigotas nos tubos digestivos e o restante destinou-se a testes de transmissão via picada em hamsters sãos. Os exemplares que realizassem um novo ingurgitamento eram dissecados para a confirmação da presença de flagelados no tubo digestivo e o monitoramento dos hamsters realizado durante um período de 4 meses⁷. Após isto, eram sacrificados e a pesquisa dos parasitos realizada no baço e fígado mediante esfregaços corados por Giemsa e cultivo em NNN com antibiótico³⁶.

RESULTADOS

Nas capturas realizadas houve uma acentuada predominância da espécie *Lu. intermedia* (95,3%) sobre as demais capturadas, com maior número de exemplares obtidos em orla de mata (Tabela 1).

Apesar do alto percentual de *Lu. intermedia* dissecado (97,1%) no período estudado, não foram detectadas formas flageladas em qualquer das espécies analisadas (Tabela 2).

Tabela 1 - Número de flebotomíneos silvestres capturados na área de estudo segundo sexo, no período de 1994 a 1998.

Espécie	Sexo		Total
	fêmea	macho	
<i>Lu. intermedia</i>	6.751	616	7.367
<i>Lu. fischeri</i>	200	4	204
<i>Lu. migonei</i>	11	11	22
<i>Lu. ayrozai</i>	119	21	140
Total	7.081	652	7.733

Tabela 2 - Número de fêmeas silvestres dissecadas para determinação de infecção natural por *Leishmania* segundo espécies de flebotomíneos, no período de 1994 a 1998.

Espécie	Nº	%
<i>Lu. intermedia</i>	5.291	97,1
<i>Lu. fischeri</i>	93	1,7
<i>Lu. migonei</i>	2	0,0
<i>Lu. ayrozai</i>	62	1,1
Total	5.448	99,9

Quanto aos teste de exposições, aplicando-se a estatística Z para comparação de proporções²⁷, verificamos que *Lu. intermedia* silvestres foram suscetíveis em iguais proporções em relação às estirpes M2903 e VR7312 de *Le. braziliensis* ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Da mesma forma, com relação às fêmeas colonizadas de idade cronológica conhecida, os índices de positividade frente às duas estirpes do parasito também foram similares, demonstrando suscetibilidade dos exemplares em iguais proporções ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 3 - Número e percentual de *Lu. intermedia* silvestres suscetíveis às estirpes de *L.(V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L. (V.)</i>	Fêmeas de <i>Lu. intermedia</i> silvestres					
	<i>braziliensis</i>	nº de expostos	nº de dissecados	nº de infectados	nº de não infectados	% de positividade
M2903		100	84	64	20	76,1
VR7312		100	82	59	23	72,0
Total		200	166	123	43	74,0

$z = 0,446$ ($p = 0,656$)

Tabela 4 - Número e percentual de *Lu. intermedia* colonizados suscetíveis às estirpes de *L.(V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L. (V.) braziliensis</i>	Fêmeas de <i>Lu. intermedia</i> colonizados				
	nº de expostos	nº de dissecados	nº de infectados	nº de não infectados	% de positividade
M2903	100	79	53	26	67,0
VR7312	100	85	62	23	73,0
Total	200	164	115	49	70,1

$z = 0,647$ ($p = 0,517$)

Nos experimentos de transmissão via picada, 39 fêmeas foram expostas a uma segunda alimentação em hamsters sãos. Dos 3 exemplares que se realimentaram, 2 revelaram-se infectados com a estirpe M2903. No experimento com a estirpe VR7312, 43

fêmeas foram expostas com o mesmo propósito, sendo que de 2 exemplares que se realimentaram, 1 estava infectado. Entretanto, em ambos os experimentos não foram detectados hamsters positivos no período de isolamento aplicado (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados das infecções de hamsters, via picada, de *Lu. intermedia* colonizados segundo estirpes de *L. (V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L.(V.) braziliensis</i>	Fêmeas de <i>Lu. intermedia</i> colonizados			
	nº de expostos à realimentação	nº de realimentados	nº de realimentados infectados	nº de hamsters limpos que se infectaram
M2903	39	3	2	0
VR7312	43	2	1	0
Total	82	5	3	0

DISCUSSÃO

Parece não haver dúvidas sobre a capacidade vetorial de *Lu. intermedia* para transmitir *Le. braziliensis* ao homem. A esta condição, soma-se a competência vetorial que pode ser avaliada mediante o encontro de seus exemplares portando infecções naturais pelos agentes parasitários¹¹ e/ou infecções em laboratório. No primeiro caso não tem sido fácil obter índices de infectividade natural, pois, em sua maioria, os flebotomíneos apresentam-se um baixo percentual de infectividade dificultando, sobremaneira, uma análise epidemiológica mais abrangente²³. *Lu. intermedia* não foge à regra, pois, tais índices tem sido baixos, apresentando-se como 0,6% (1/160)¹³, 0,1% (1/527)²⁹ e 0,2% (4/1819)⁴.

No Vale do Ribeira, algumas espécies foram examinadas incluindo *Lu. intermedia* (Tabela 1). Ao longo de muitos anos, apesar de dissecadas milhares de fêmeas, em nenhuma delas foram detectadas formas flageladas

em seus tratos digestivos (Tabela 2). Isto pode confirmar a tendência natural para reduzida taxa de infecção de *Lu. intermedia*, a despeito do registro simultâneo de elevadas densidades e de surtos da doença. No caso dessa região, a complexidade do ciclo de transmissão de *Leishmania* em que o homem esteja envolvido apenas é nítido para o ambiente extraflorestal em detrimento ao florestal preservado pobre em densidade de *Lu. intermedia*¹⁵.

A especificidade flebotomíneo/*Leishmania* parece representar um relevante pré-requisito na identificação da espécie vetora. Entretanto, a suposta condição de especiação de *Leishmania* se relacionada a flebotomíneos neotropicais, sugere-se uma maior flexibilidade em sua especificidade, suportando o desenvolvimento de estirpes do subgênero *Leishmania* e/ou *Viannia*³⁷. Assim, para *Lu. intermedia*, vários testes

de suscetibilidade mediante repasto sangüíneo de fêmeas em animais infectados já foram executados resultando em positividade de 25% (11/43) para *Le. (L.) chagasi*⁶; de 100% (23/23) para isolado de leishmaniose nodular difusa⁸; de 58% com *Le. (V.) braziliensis* isolada no município do Rio de Janeiro²⁸ e de 65% e 25% com estirpes colombiana de *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (V.) panamensis*³¹, respectivamente.

As exposições de *Lu. intermedia* às estirpes de *Le. braziliensis* oriundas do Amazonas e Vale do Ribeira, demonstraram percentuais significativos de positividade tanto para fêmeas silvestres, portanto com idade desconhecida, quanto para fêmeas de laboratório com idade entre 2 e 3 dias (Tabelas 3 e 4), sugerindo então ser discutível se a especificidade representou alguma barreira à infecção de *Lu. intermedia*. Aliás, Coelho e colaboradores⁸ quando obtiveram seus resultados acreditaram não ser aquela característica importante na relação flebotomíneo/*Leishmania*.

De qualquer forma, a localização das formas infectantes no tubo digestivo do flebotomíneo corrobora como indicador de especificidade, devido facilitar a passagem do parasito ao hospedeiro vertebrado. Assim, para que associações no subgênero *Viannia* sejam consideradas específicas sugere-se que deva ocorrer a migração das promastigotas às partes bucais do inseto, além de maciça infecção do proventrículo subsequente a colonização do piloro e íleo³¹. Neste estudo, observamos que em 49,5% (118 exemplares) dissecados infectados, e em 2 realimentados, as localizações no tubo digestivo (piloro, íleo, cárdia e proventrículo) das formas evolutivas das duas estirpes de *Leishmania* testadas foram compatíveis ao modelo de desenvolvimento Peripilaria²⁵.

A transmissão do parasito via picada da fêmea flebotomínea é considerada como prova conclusiva de característica vetorial²⁴ e, entretanto, testes de transmissão com parasitos do “complexo *braziliensis*”

são relatados em pequeno número quando comparados àqueles do subgênero *Leishmania*^{23 34}. Assim, associações como *Lu. gomezi/Le. braziliensis*²⁹, *Lu. longipalpis/Le. braziliensis*⁹ e *Lu. wellcomei/Le. braziliensis*³² foram realizados, com sucesso, entretanto, apenas nesse último experimento. Neste contexto, a artificialidade do laboratório, a reutilização de uma mesma fonte sangüínea para os ingurgitamentos, a ausência de algum elemento químico ou físico que estimulasse o repasto sangüíneo e uma biologia especial do grupo *Viannia*, são fatores sugeridos como possíveis dificultadores para o sucesso desses experimentos e, inclusive, em nossa associação *Lu. intermedia/Le. braziliensis* (Tabela 5). Aliado a isto, menciona-se ainda, as dificuldades para se conseguir a passagem do parasito para hamsters via picada uma vez que a maioria das fêmeas infectadas recusa-se a um segundo ou terceiro repasto sangüíneo, não obstante existirem relatos bem sucedidos a partir de exemplares que não realimentaram ou só o fizeram parcialmente^{3 26 35}. A análise destes resultados portanto, leva à consideração de que os testes de transmissão foram inconclusivos quanto a definição da competência vetorial de *Lu. intermedia*, à semelhança, entretanto, de outros experimentos com diferentes combinações de flebotomíneo/*Leishmania* que também tiveram resultados negativos, mesmo quando foram utilizados insetos intensamente parasitados, inclusive com formas evolutivas na faringe e/ou probóscida³⁹. Conclui-se ainda que embora não tenha sido possível atender a todos os requisitos de incriminação vetorial propostos por Killick-Kendrick e Ward²⁴, a comprovação da suscetibilidade de *Lu. intermedia* frente às estirpes de *Le. braziliensis* e suas localizações no trato digestivo, somada aos indicadores epidemiológicos estudados concorrem para a suspeita de papel epidemiológico desse flebotomíneo, pelo menos, na região do Vale do Ribeira.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati pela valiosa contribuição nos ensinamentos para identificação dos flebotomíneos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S, Theodor O. The experimental transmission of cutaneous leishmaniasis to man from *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 19: 365-371, 1925.
- Bastos JMCMG. Observações à margem de surto epidêmico de leishmaniose tegumentar no vale do Ribeira, (São Paulo). *Boletim da Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária* 37: 73-86, 1978.
- Beach R, Kiilu G, Hendricks L, Oster C, Leeuwenburg J. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 747-751, 1984.
- Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati, EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the valley of the Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. *Boletim de la Dirección de Malariologia y Saneamiento Ambiental* 35 (supl 1): 77-84, 1995.
- Castro GO. Sobre um processo de cultura de flebotomos. Nota prévia. *Sociedade de Biologia, Sessão de 8 de outubro de 1937, Rio de Janeiro, RJ, 1937.*
- Chagas AW. Criação de flebotomos e transmissão experimental da leishmaniose visceral americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 35: 327-333, 1940.
- Coelho MV, Falcão AR. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II- Transmissão de amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* e *Phlebotomus renei*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4: 220-224, 1962.

8. Coelho MV, Falcão AR, Falcão AL. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. I- Evolução de *L. braziliensis* em flebotomo. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 9: 177-191, 1967.
9. Coelho MV, Falcão AR, Falcão AL. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. V- infectividade de leptomonas evoluindo no flebotomo e experiências de transmissão de leishmanioses. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 9: 367-373, 1967.
10. Forattini OP. Entomologia médica. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.1, 1962.
11. Forattini OP. Ecologia, epidemiologia e sociedade. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 239-353, 1992.
12. Forattini OP, Oliveira O. Um foco de leishmaniose tegumentar na zona sul do Estado de São Paulo, Brasil. Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo 11: 23-24, 1957.
13. Forattini OP, Pattoli DGB, Rabello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública 6: 431-433, 1972.
14. Forattini OP, Rabello EX, Serra OP, Cotrim MD, Galati EAB, Barata JMS. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública 10: 31-43, 1976.
15. Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia 67: 55-60, 1992.
16. Gomes AC, Galati EAB, Casanova C, Domingos MF, Marques GRAM, Neves VLFC. Analysis of the geographical distribution of leishmaniasis vectors in the State of São Paulo, Brazil. Boletín de la Dirección de Malaria y Saneamiento Ambiental 35 (supl 1): 143-146, 1995.
17. Gomes AC, Ottati SM, Shaw JJ, Lainson R, Yamamoto YI. Active transmission of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra de Mar forest, São Paulo, Brazil. Transactions of the Tropical Medicine and Hygiene 83: 193, 1989.
18. Gomes AC, Yamamoto YI, Capinzaiki NA, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 34: 149-158, 1992.
19. Hertig M. Phlebotomus and Carrion's disease. The American Journal of Tropical Medicine 22 (suppl), 1942.
20. Hertig M, McConnell E. Experimental infection of panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. Experimental Parasitology 14: 92-106, 1963.
21. Jaramillo C, Travi BL, Montoya J. Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. Medical and Veterinary Entomology 8: 1-7, 1994.
22. Johnson PT, McConnell E, Hertig M. Natural infections of Leptomonad flagellates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. Experimental Parasitology 14: 107-122, 1963.
23. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Medical and Veterinary Entomology 4: 1-24, 1990.
24. Killick-Kendrick R, Ward RD. Ecology of *Leishmania*. Parasitology 82: 143-152, 1981.
25. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine, Academic Press, London, v.1, p.1-120, 1987.
26. Lawyer PG, Young DG. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from United States. Journal of Medical Entomology 24: 458-462, 1987.
27. Pereira JCR. Análise de dados qualitativos. Estratégias metodológicas para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 93, 1999.
28. Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) under experimental conditions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87: 235-238, 1992.
29. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 79: 395-396, 1984.
30. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80: 219-26, 1985.
31. Rangel EF, Travi BL, Barbosa AF, Montoya J. Development of Colombian isolates of *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Le. (V.) guyanensis* and *Le. (V.) braziliensis* in the sandfly *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) under experimental conditions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 88: 513-515, 1993.
32. 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 rôle of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81: 353-359, 1987.
33. Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. American Journal of Tropical Medicine 19:131-38, 1939.
34. Sherlock IA. Há especificidade dos flebotomíneos para as Leishmânias? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30 (supl.1): 151-155, 1997.
35. Strangways-Dixon J, Lainson R. Dermal leishmaniasis in British Honduras: transmission of the *L. braziliensis* by *Phlebotomus* species. British Medical Journal 3:297-299, 1962.
36. Wallton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. Journal of Parasitology 63:1118-1119, 1977.
37. Walters LL, Irons KP, Chaplin G, Tesh RB. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 30: 699-718, 1993.