



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**DÉBORA ELIENAI DE OLIVEIRA MIRANDA**

**ECOLOGIA DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE) EM UMA ÁREA RURAL ENDÊMICA PARA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

**RECIFE**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**ECOLOGIA DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE) EM UMA ÁREA RURAL ENDÊMICA PARA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

**DÉBORA ELIENAI DE OLIVEIRA MIRANDA**

**Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gílcia Aparecida de Carvalho Silva**

**RECIFE – PE**

**2015**

Ficha catalográfica

M672e Miranda, Débora Elienai de Oliveira  
Ecologia da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae)  
em uma área rural endêmica para leishmaniose tegumentar  
americana no estado de Pernambuco / Débora Elienai de  
Oliveira Miranda. – Recife, 2015.  
70 f. : il.

Orientadora: Gílcia Aparecida de Carvalho Silva..  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. *Lu. whitmani* 2. Ecologia 3. Biologia molecular  
I. Silva, Gílcia Aparecida de Carvalho, orientadora II. Título

CDD 636.089

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou  
utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que  
respeitadas às normas de ética científica.

*Dedico este trabalho a minha família que é a fonte  
de minha energia..... AMO MUITO VOCÊS!*

*Mergulha a mente, quanto possível, no estudo. O estudo liberta da ignorância e favorece a criatura com o discernimento. O estudo e o trabalho são as asas que facilitam a evolução do ser. O conhecimento é mensagem de vida. Não apenas nos educandários podes estudar. A própria vida é um livro aberto, que ensina a quem deseja aprender.*

*Joanna de Ângelis*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos com muita luz, amor, sabedoria e conduzir minhas vitórias e conquistas.

A minha família pelo amor, apoio e incentivo, pela saudade enorme que superou distâncias e a certeza de que sempre tive a compreensão incondicional deles. Agradecendo em especial àquela que, como disse Drummond, "tem cheiro de passarinho quando canta, de sol quando acorda e de flor quando ri", MÃE, te amo!

Ao meu esposo Henrique Araújo, pela paciência, amor e incentivo. A realização pessoal nos fornece a energia para a busca profissional, a força e o estímulo para sempre continuar uma jornada.

À professora Dr.<sup>a</sup> Gílcia Aparecida de Carvalho, minha orientadora e amiga, por sua doçura, pela generosidade, conselhos, ensinamentos e valiosas considerações, ressaltando a grande compreensão que faz de ti um ser iluminado. Pelo prazer em ensinar, bastante evidente quando deixa transparecer a alegria pelo sucesso, mesmo nas mais simples vitórias. A minha eterna gratidão e o meu muitíssimo obrigada!

À URFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Às professoras Dr.<sup>a</sup> Rozélia Bezerra e Dr.<sup>a</sup> Andrea Paiva de Moura, pelo amor e carinho a mim dedicados, seres de luz e solidariedade. Simplesmente amo!

À professora Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Faustino pelo total apoio em cada passo dado durante essa caminhada, pelos conselhos de mãe, pela amizade e confiança.

Ao professor Dr. Leucio Câmara Alves pelo apoio essencial à realização deste trabalho disponibilizando o material de coleta, por sua competência e por ser um exemplo de dedicação no laboratório.

Aos queridos amigos, Gisele Ramos, Ivanise Santana, Ana Carolina Messias, Silvia Marques, Jussara Ramos, Rodolfo Godoy, Rodrigo Tenório e Ana Patrícia pelo carinho, aprendizado e pelos belos momentos de descontração.

A todos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos – UFRPE por todos os ensinamentos, apoio e carinho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

Ao Dr. Sinval Pinto Brandão Filho por ter me apresentado o perfeito mundo dos flebotomíneos, pela simplicidade e confiança com que me recebeu no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Seu apoio tornou o meu sonho possível e isso jamais esquecerei. OBRIGADA!

Ao Dr. Filipe Dantas Torres, pela inacreditável disposição em ajudar e pelo prazer de contribuir com esse trabalho. Agradeço também pela incrível oportunidade oferecida a mim de poder realizar o trabalho do CIMNC, sem o qual possivelmente não teria evoluído da forma que evoluí, e com o qual encontrei uma direção dentro de minha profissão. Oportunidade de ouro que veio quando todas as portas pareciam já estar fechadas.

Ao Fernando José da Silva, querido amigo-irmão! A gratidão pelo aprendizado na identificação de flebotomíneos e nas coletas, na verdade, tal gratidão não tem como ser expressa em um simples texto. Agradeço-te imensamente pelo companheirismo e pelas valiosas trocas de experiências.

A Kamila Gaudêncio (*Amo Tu*), pelo simples fato de ter aceitado a minha amizade, e pelos diversos momentos de compreensão, ajuda, tolerância, sinceridade, e claro, de brincadeiras.

Aos amigos do Departamento de Imunologia (Fiocruz) que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, em especial a Pietra Lemos (Chefa linda), Abilene Moura, Rayana Moraes, Luciana Figueredo, Lays Trajano, Júnior Marinho, Kyldman Thais, Vanessa Fitipaldi, Suênia, Cínthia, Luana Patrícia e Assis Nunes. Adoro vocês!

A todos profissionais da Escola Coronel Othon pelo carinho, pela torcida e compreensão.

As minhas queridas amigas Bárbara Ribeiro, Lorena Cedraz, Ise Sousa, Jéssica Mirela e Kedma Mota que apesar da distância sempre me acompanharam nessa trajetória.

A todos os professores e colegas pela amizade e convívio ao longo do curso.

À Prefeitura Municipal do Ipojuca pelo apoio e presteza em todos os momentos deste trabalho. Em especial a Bárbara, Eduardo e Jó. A localidade do Engenho Fortaleza, pelo acolhimento e pelo sorriso das crianças que fortaleciam a realização deste trabalho.

**OBRIGADA!**



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 Aspectos Históricos .....	19
2.2 Flebotomíneos: Sistemática .....	20
2.3 Ciclo biológico, morfologia e habitat.....	21
2.4 Hospedeiros susceptíveis.....	23
2.5 Distribuição geográfica .....	26
2.6 Importância das espécies de flebotomíneos na saúde pública .....	27
2.6.1 Diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.....	29
2.7 Degradação ambiental e leishmaniose .....	30
3. OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo Geral .....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4. REFERÊNCIAS .....	34
5. ARTIGO .....	46
5.1 Artigo I .....	47
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	68
7. APÊNDICES .....	69

**LISTA DE FIGURAS**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

<b>Figura 1.</b>	Ciclo biológico de flebotomíneos. Fonte: Adaptado de Hernández (2001) .....	22
<b>Figura 2.</b>	Genitália de <i>Lu. whitmani</i> utilizadas na identificação da espécie, <b>A</b> - espermoteca da fêmea, seta preta e <b>B</b> - parâmero do macho, caixa preta. <b>Fonte:</b> Miranda (2014) .....	24
<b>Figura 3.</b>	Fêmea de <i>Lutzomyia</i> spp. ingurgitada. Fonte: Miranda (2014).....	25

**LISTA DE FIGURAS**  
**ARTIGO**

<b>Figure 1</b>	Predominant landscapes of the study area: Atlantic rainforest (A) and sugar cane plantations (B).....	63
<b>Figure 2</b>	Number of specimens collected according to month of collection. Only the five most abundant species are shown.....	63
<b>Figure 3</b>	Percentage of sand flies collected according to collection site.....	64
<b>Figure 4</b>	Correlation between daily number of sand flies collected and temperature (A), rainfall (B), relative humidity (C) and saturation deficit (D).....	64

**LISTA DE TABELAS**  
**ARTIGO**

<b>Table 1</b>	Coordinates and description of the collection sites included in this study...	65
<b>Table 2</b>	Sand fly species collected according to sex and collection sites, 2013–2014, Pernambuco, north-eastern Brazil. The standardized index of species abundance (SISA) is also provided.....	66
<b>Table 3</b>	Diversity indices based on data obtained from monthly collections, 2013–2014, Pernambuco, north-eastern Brazil.....	67

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

d.C – depois de Cristo

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

mm – Milímetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RFLP – Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo do comprimento dos fragmentos terminais de restrição)

μL – Microlitro

## RESUMO

Os flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) estão distribuídos por diversas regiões zoogeográficas do mundo, sendo representados por várias espécies encontradas em maior abundância, nas regiões tropicais e subtropicais. Estes dípteros apresentam grande relevância na saúde pública, porque estão envolvidos na transmissão dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV), as quais estão entre as doenças tropicais de maior importância no Brasil e em muitos países do mundo. O presente estudo teve como objetivo estudar a ecologia de flebotomíneos em uma área rural endêmica para leishmaniose tegumentar americana no estado de Pernambuco. As coletas de flebotomíneos foram realizadas no período de agosto de 2013 a agosto de 2014, com armadilhas luminosas do tipo CDC, mensalmente, durante três noites consecutivas, das 17:00 horas às 6:00 horas, totalizando sete armadilhas. Cada armadilha foi posicionada a 1,5m do solo, sendo instalada em três diferentes ambientes: intradomicílio, peridomicílio e mata. Os locais de captura foram selecionados próximos a tocas de animais silvestres, troncos de árvores de grande porte, em locais sombreados e úmidos. Os exemplares capturados foram examinados, separados de acordo com sexo e mantidos em etanol 70%. Os flebotomíneos coletados foram identificados com base na morfologia e fêmeas de *Lutzomyia whitmani* (n = 169), *Lutzomyia amazonensis* (n = 134) e *Lutzomyia complexa* (n = 21) foram selecionadas e avaliadas por PCR para a presença de *Leishmania* (*Viannia*) spp. No total, foram identificados 5.167 espécimes de flebotomíneos de 19 espécies, sendo que *Lutzomyia choti* (43,2%) foi a espécie mais frequente, seguido por *Lu. amazonensis* (16,6%), *Lu. whitmani* (15,8%), *Lutzomyia sordellii* (10,7%) e *Lutzomyia quinquefer* (5,8%), que juntos representaram mais de 90% dos flebotomíneos coletados. As fêmeas avaliadas por PCR foram negativas para *Leishmania* (*Viannia*) spp. O estudo demonstrou que há uma variedade importante de espécies na área supracitada, podendo algumas dessas espécies estarem associadas a casos humanos notificados de LTA. O encontro da espécie *Lu. whitmani*, comprovadamente vetora de leishmaniose tegumentar em diversas regiões brasileiras, pode sugerir sua participação na transmissão de LTA em Ipojuca.

Palavras-chave: *Lu. whitmani*, ecologia, LTA, epidemiologia, biologia molecular.

## ABSTRACT

Sand flies belonging to the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) are spread over several zoogeographic regions of the world, being represented by several species found in greater abundance in tropical and subtropical regions. These flies have great relevance to public health, because they are involved in the transmission of the causative agents of American cutaneous leishmaniasis (ACL) and visceral leishmaniasis (VL), which are among the most important tropical diseases in Brazil and in many countries worldwide. This study aimed to study the ecology of sandflies in an endemic rural area for American cutaneous leishmaniasis in the state of Pernambuco. Sandfly collections were conducted from August 2013 to August 2014, with CDC light traps, type on a monthly basis for three consecutive nights, from 5:00 pm to 6:00 am totaling seven traps. Each trap was placed at 1.5m, being installed in three different environments: indoors, outside the home and kills. The capture sites were selected near dens of wild animals, large tree trunks, in shaded and humid places. The specimens captured were examined, separated according to sex and kept in 70% ethanol. Collected sand flies were identified based on morphology and females of *Lutzomyia whitmani* (n = 169), *Lutzomyia amazonensis* (n = 134) and *Lutzomyia complexa* (n = 21) were selected and evaluated by PCR for the presence of *Leishmania* (*Viannia*) spp. In total, 5,167 sand flies belonging to 19 species were identified, being that *Lutzomyia choti* (43.2%) was the most frequent species, followed by *Lu. amazonensis* (16.6%), *Lu. whitmani* (15.8%), *Lutzomyia sordellii* (10.7%) and *Lutzomyia quinquefer* (5.8%), which together represented over 90% of the collected sand flies. Females assessed by PCR were negative for *Leishmania* (*Viannia*) spp. The study showed that there is an important variety of species in the above area, although some of these species are associated with human cases reported of ACL. The meeting of the species *Lu. whitmani* proven vector of cutaneous leishmaniasis in several Brazilian regions, may suggest their participation in the ACL in Ipojuca.

Keywords: *Lu. whitmani*, ecology, ACL, epidemiology, molecular biology.

## 1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Phlebotomidae) estão distribuídos por diversas regiões zoogeográficas do mundo, sendo representados por várias espécies encontradas em maior abundância, nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (MAROLI et al., 2013). Este grupo de insetos apresenta enorme relevância na saúde pública, porque está envolvido na transmissão dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV), as quais estão entre as doenças tropicais de maior importância no Brasil e em muitos países do mundo (DANTAS-TORRES et al., 2012; MAROLI et al., 2013).

Desjeux (2001), analisando a alta prevalência da LTA em muitas áreas da América Latina, observou o incremento do número total de casos com incidência em todas as faixas etárias, acometendo homens e mulheres com a enfermidade e de padrão de transmissão, predominantemente, doméstico e peridomiciliar. Surtos da doença estão associados com mudanças na distribuição geográfica dos vetores, geralmente determinadas pelo próprio homem, como o desmatamento para plantações, criações de estradas e animais próximos a áreas de mata primária ou secundária, locais onde os flebotomíneos normalmente estão presentes (DANTAS-TORRES et al., 2010).

O Brasil representa um dos maiores focos de leishmaniose no mundo (ALVAR et al., 2012), e várias espécies de flebotomíneos, como por exemplo, *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, *Lu. longipalpis* e *Lu. complexa* estão envolvidas na transmissão de *Leishmania* spp. para os seres humanos (RANGEL e LAINSON, 2009; MAROLI et al., 2013). Anualmente, 30 mil casos de leishmaniose cutânea são notificados às autoridades de saúde pública e a maioria é causada por *Leishmania braziliensis*. Diferentes espécies de flebotomíneos têm sido incriminados na transmissão de *L. braziliensis*, incluindo *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, *Lu. complexa*, *Lu. neivai*, *Lu. fischeri* e *Lu. migonei* (ALVAR et al, 2012; MAROLI et al, 2013).

Recentes estudos tem demonstrado uma clara expansão da área de ocorrência de flebotomíneos (por exemplo, *Lutzomyia whitmani*) e, conseqüentemente da área de ocorrência da LTA e LV nas Américas (COSTA et al., 2007; RANGEL e LAINSON, 2009). As mudanças na distribuição desses vetores estão provavelmente relacionadas a mudanças ambientais e climáticas. Contudo, os dados sobre a ecologia desses dípteros



são ainda incipientes, principalmente no Nordeste do Brasil, não obstante a importância da doença nessa região. A falta de conhecimento sobre a ecologia de flebotomíneos limita a possibilidade de elaboração de novas medidas de controle mais eficazes e a elaboração de modelos preditivos que possam fornecer informações sobre as áreas e períodos de maior risco de transmissão.

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram notificados 32 casos humanos de LTA em Ipojuca entre 2009 e maio de 2014. Existe, pouca informação sobre a fauna de flebotomíneos e espécies de *Leishmania* que circulam em flebotomíneos, animais e humanos em Ipojuca. Desta forma, este estudo constitui importante contribuição para o conhecimento da sazonalidade e da epidemiologia das diferentes espécies de flebotomíneos do Estado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os flebotomíneos são conhecidos popularmente como: “mosquito-palha”, pois apresentam uma coloração amarelada semelhante à palha vegetal; “asa-branca” e “asa-dura”, por possuírem asas com formato lanceolado que se mantêm eretas durante o pouso; “tatuquira”, devido ao hábito de se abrigarem em buracos de tatu; “arrepiado”, por possuírem o corpo piloso; e “pula-pula”, devido ao voo do tipo saltitante. Estes nomes variam dependendo da região brasileira (MARTINS et al., 1978).

Eles são insetos de grande importância médica e veterinária, devido a sua capacidade de transmitir bactérias, vírus e protozoários para o homem e animais (MAROLI et al., 2013). As doenças transmitidas por vetores estão entre os principais problemas de saúde pública em muitos países em desenvolvimento e industrializados (COLWELL; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2011). Doenças como dengue, malária, leishmaniose e doença de Chagas continuam a causar um impacto enorme na saúde pública, incluindo gastos com diagnóstico, tratamento e controle podem alcançar cifras exorbitantes. Fatores de ordem biológica, geográfica, ecológica, social, cultural e econômica podem influenciar diretamente a distribuição e impacto causado pelas doenças transmitidas por vetores (TAUIL, 2002).

### 2.1 Aspectos Históricos

Os primeiros dípteros da subfamília Phlebotominae registrados na literatura surgiram no Cretáceo Inferior (LEWIS, 1982). A primeira espécie de flebotomíneo foi descrita por Scopoli na Itália em 1786, tal espécie foi chamada por muito tempo de *Bibio papatasi* e atualmente é conhecida como *Phlebotomus papatasi* (DEDET; VIGNES; RANGEL, 2003). Os primeiros flebotomíneos americanos foram descritos por Coquillett (1907), sendo eles: *Flebotomus vexator* e *F. cruciatus*. Coquillett (1907) e Lutz e Neiva (1912) foram os primeiros pesquisadores a descrever a presença dos flebotomíneos no Brasil.

Nas Américas, a LTA é conhecida desde a época pré-colombiana (400 a 900 d.C.), através de cerâmicas peruanas e equatorianas, que documentam em potes Mochica e Huaco, faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios, semelhantes às provocadas pela leishmaniose mucocutânea (BRÜCKER; GENTILINI, 1987).

A confirmação de que a transmissão das leishmanioses ocorria através da picada de flebotomíneos foi realizada no Velho Mundo em 1921, mas apenas um ano após essa comprovação, Henrique Aragão (1922) atribui a uma espécie de flebotomíneo a transmissão de LTA na cidade do Rio de Janeiro. Este pesquisador relacionou a presença de *Lutzomyia intermedia* à ocorrência de LTA por *Leishmania braziliensis* em área endêmica, conseguindo reproduzir lesão experimental em focinho de cão a partir da inoculação destes insetos macerados (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003; RANGEL; LAINSON, 2003). Em 1940, em estudo no Estado de São Paulo, foram encontradas infecções naturais de promastigotas em *Lu. migonei*, *Lu. whitmani* e *Lu. pessoai* (PESSOA; PESTANA, 1940).

## 2.2 Flebotomíneos: Sistemática

Os flebotomíneos estão classificados taxonomicamente, de acordo com Forattini (1973) e Young; Duncan (1994), como segue:

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Filo: Arthropoda Von Siebold, 1848

Classe: Insecta Linnaeus, 1758

Ordem: Diptera Linnaeus, 1758

Sub-ordem: Nematocera

Família: Psychodidae

Sub-família: Phlebotominae Rondani, 1840

A subfamília Phlebotominae é composta por seis gêneros: *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987 no Velho Mundo e *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1984 no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994).

A classificação de flebotomíneos tem sido bastante discutida atualmente. As primeiras classificações foram feitas por Theodor (1948) e Lewis et al., (1977), os quais descreveram dois gêneros para o Velho Mundo *Phlebotomus* Rondani e *Sergentomyia* França e três gêneros para o Novo Mundo *Lutzomyia* França, *Brumptomyia* França & Parrot, e *Warileya*, Hertig. O gênero *Chinius* Leng, 1987 é utilizado somente na China

por alguns pesquisadores. O gênero *Phlebotomus* (11 subgêneros, 96 espécies e 17 subespécies) foi reorganizado por Lewis (1982), de acordo com Maroli et al., (2013).

Em relação aos flebotomíneos neotropicais, muitos entomologistas continuam seguindo a classificação de Lewis et al., (1977) revisada por Young; Duncan (1994), que reconhecem os três gêneros (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*) com 15 subgêneros e 11 espécies (MAROLI et al., 2013). A classificação mais utilizada atualmente foi proposta por Galati (2003), o qual reconhece 464 espécies de flebotomíneos neotropicais agrupados em 23 gêneros, 20 subgêneros e três grupos de espécies (WHO, 2010).

*Lutzomyia* é o maior gênero de flebotomíneos do Novo Mundo e com maior distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina. Dentre as 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, mais de 400 pertencem ao gênero *Lutzomyia*. O gênero é formado por 15 subgêneros e 11 grupos de espécies (YOUNG; DUNCAN, 1994).

### **2.3 Ciclo biológico, morfologia e habitat**

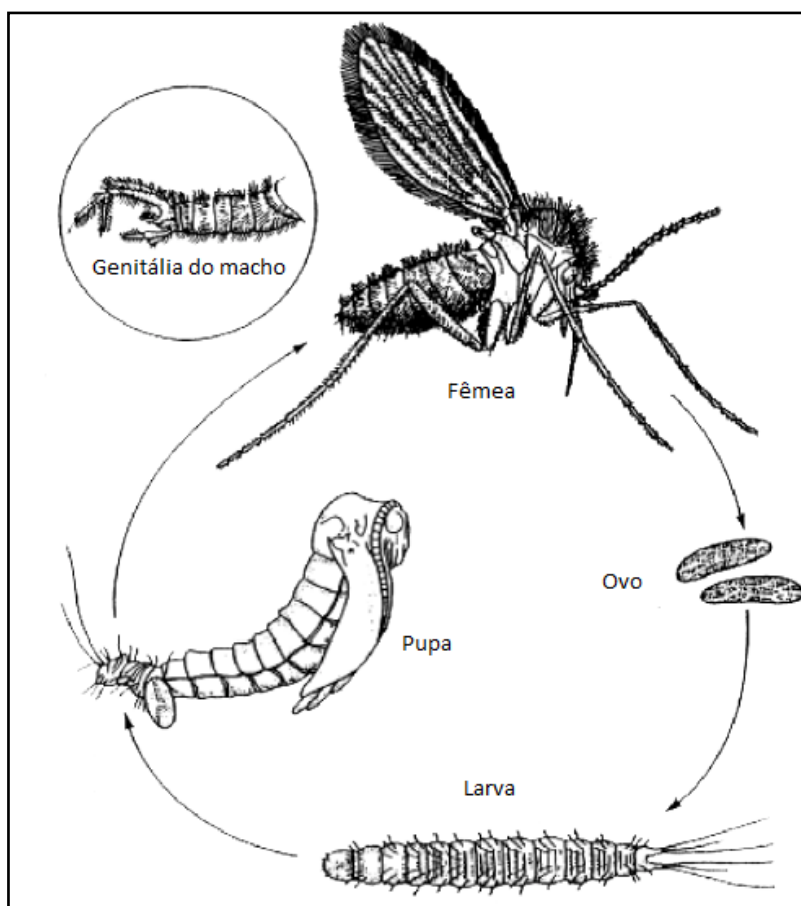
Os flebotomíneos são insetos cujo ciclo de vida é holometábolo, ou seja, englobam quatro fases de desenvolvimento (Figura 1): ovo, larva (com quatro estádios que diferem sensivelmente entre si na morfologia e fisiologia), pupa e adulto (FORATTINI, 1973).

Os ovos são ovóides, alongados e pouco encurvados, medindo 0,3-0,5 mm de comprimento por 0,7-0,15 mm de largura. Após a postura são brilhantes e esbranquiçados e dentro de 2-3 horas ficam escuros (SHERLOCK; SHERLOCK, 1959). A postura é feita isoladamente ou em grupos, permanecendo aderidos ao substrato, devido a uma substância produzida pelas glândulas acessórias (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Tal substância é composta basicamente de ácidos graxos e recobre todo o ovo, favorecendo uma permeabilização e atuando também como feromônio de oviposição (REY, 1992; BRAZIL; BRAZIL, 2003; RANGEL; LAINSON, 2003; MAROLI et al., 2013). Entre 7-17 dias após a postura dos ovos acontece a eclosão das larvas, que ocorrerá de acordo com as condições ambientais (substrato úmido, sombreado e rico em matéria orgânica) e também da quantidade e da composição química do sangue ingerido pela fêmea (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

As larvas são vermiformes, pequenas e claras com uma cápsula cefálica escura e mandíbulas robustas. Alimentam-se de matéria orgânica do criadouro, das cascas dos ovos eclodidos e dos corpos dos adultos mortos após a postura. Todo segmento abdominal é coberto por cerdas, que pode variar de acordo com os estádios e a espécie. As larvas são terrestres, desenvolvem-se em micro habitats com abundância em matéria orgânica, com duração de três semanas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

As pupas possuem cefalotórax e abdômen, fixam-se imóveis ao substrato, esbranquiçadas, ficando escuras à medida que se aproxima a emergência do adulto, que leva de 20-40 dias (MARCONDES, 2001). São compostas por 13 segmentos. Os quatro primeiros, mais ou menos fundidos, formam o cefalotórax, ao passo que os nove restantes são individualizados e constituem o abdômen (FERRO et al., 1997; BRAZIL; BRAZIL, 2003).

O adulto possui antenas longas com 14 flagelômeros, corpo e asas recobertas de espessa pilosidade, a probóscide tem comprimento de 1-3 mm e é semelhante ao do restante da cabeça quando apontado para o substrato. Possui corpo revestido por pelos e são de coloração clara (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).



**Figura 1** - Ciclo biológico de flebotomíneos. Fonte: Adaptado de Hernández (2001).

Os machos e as fêmeas distinguem-se morfologicamente em suas probóscides, mais curta nos machos que nas fêmeas, sendo longa e adaptada para picar e sugar e tendo os últimos segmentos abdominais, modificados para constituir a genitália do inseto: nas fêmeas os segmentos menores e discretos dispõem-se como estruturas telescopadas, as quais conferem aspecto arredondado à genitália do inseto, denominada espermateca (Figura 2A), enquanto no macho está presente um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados em forma de ganchos formando o parâmero (Figura 2B) (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

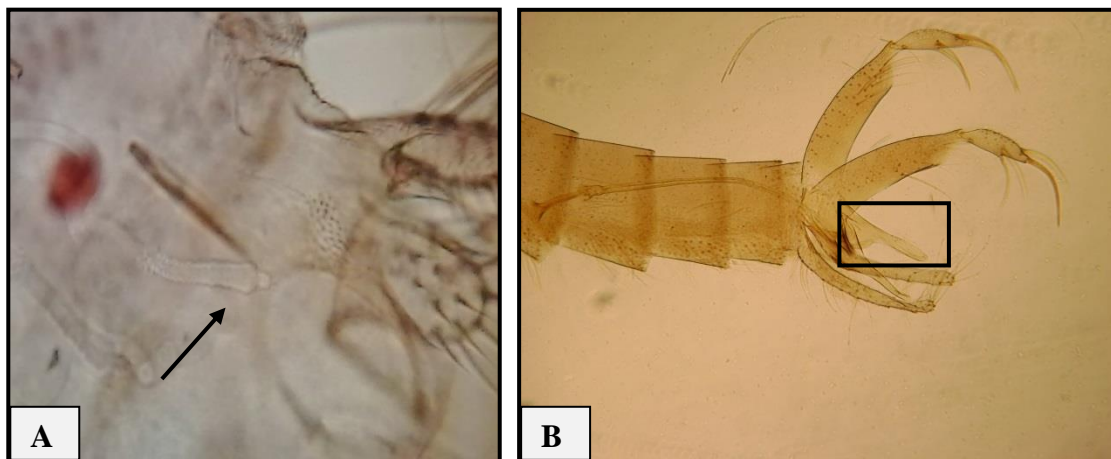
#### **2.4 Hospedeiros susceptíveis**

Os hospedeiros susceptíveis de flebotomíneos são os animais domésticos e humanos.

Campbell-Lendrum et al., (1999) em experimentos realizados no campo demonstraram que *Lu. whitmani* são mais atraídas por iscas humanas que por cães e galinhas provenientes da Amazônia. Em estudos feitos por Ximenes et al., (1999) a densidade de flebotomíneos em abrigos de animais domésticos e silvestres no estado do Rio Grande do Norte evidenciaram que *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia evandroi* se apresentaram como espécies ecléticas no que se refere a escolha de seus hospedeiros. Essas espécies de flebotomíneos tiveram sua preferência alimentar por cavalos (*Equus caballus*), tatus (*Euphractus sexcintus*), galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e preás (*Galea spixii*).

Estudos mostram que o comportamento alimentar e a atração interespecífica das espécies de flebotomíneos, tornam evidente a preferência dos mesmos por determinados hospedeiros, porém a maioria das espécies são oportunistas. Tal comportamento é importante no ciclo zoonótico da leishmaniose, associado à idade, abundância e comportamento do hospedeiro (ANDRADE, 2008).

Assim, há uma grande necessidade de mais estudos biológicos, ecológicos e taxonômicos que apresentem subsídios para alternativas de controle de flebotomíneos.



**Figura 2.** Genitália de *Lu. whitmani* utilizadas na identificação da espécie, **A** - espermateca da fêmea, seta preta e **B** - parâmero do macho, caixa preta. **Fonte:** Miranda (2014).

As espécies de flebotomíneos de acordo com Aguiar e Medeiros (2003) podem ser divididas em três categorias:

- a) silvestres, que vivem nas florestas ou em regiões não florestais, porém só acidentalmente são encontradas associadas ao homem e aos animais domésticos;
- b) peridomiciliares, que vivem fora das habitações humanas e de animais domésticos somente procurando-as para obtenção do repasto sanguíneo;
- c) intradomiciliares, que vivem associados ao homem e aos animais domésticos, no interior de habitações ou próximo delas.

Estes insetos são bastante pequenos, frágeis, apresentam atividade noturna e voo curto e direto. As fêmeas precisam de sangue para amadurecer os ovócitos para postura de ovos férteis (Figura 3) e ambos os sexos precisam de açúcar para fins energéticos, obtidos principalmente a partir de tecidos vasculares de plantas. No entanto algumas espécies como *Lutzomyia lichyi*, fazem a primeira oviposição sem se alimentarem de sangue (MONTROYA-LERMA, 1992). Os flebotomíneos adultos abrigam-se durante o dia em lugares escuros e úmidos como tronco de árvores, toca de animais ou sob rochas. Os ovos se estabelecem em micro habitats terrestres ricos em matéria orgânica, que fornecem alimento para as larvas (ALEXANDER, 2000).



**Figura 3.** Fêmea de *Lutzomyia complexa* ingurgitada. Fonte: Miranda (2014)

Embora se conheça o hábito alimentar das formas imaturas, principalmente através de estudos feitos com colônias de *Lu. longipalpis* mantidos em laboratório, pouco se conhece sobre criadouros naturais das larvas de flebotomíneos nas Américas. As formas imaturas têm sido encontradas em ambientes domésticos (construções abandonadas, fendas de chão, paredes e porões de casas), peridomésticos (tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras e aterros) e silvestres (formigueiros, cavernas, raízes tubulares, tocas de gerbis e roedores) (FELICIANGELI, 2004). As formas imaturas são difíceis de encontrar e ainda há muito a ser descoberto sobre os sítios de reprodução dos flebotomíneos dada sua alta capacidade de recolonizar o que restringe as opções para controle vetorial (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).



## 2.5 Distribuição geográfica

Os flebotomíneos encontram-se distribuídos na Ásia, África, Austrália e nas Américas (sul e central) (KILLICK-KENDRICK, 1999). São encontrados também na Europa sendo comuns em regiões do Mediterrâneo, podendo ocorrer em zonas rurais e urbanas (READY, 2010; TARALLO et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2010), mas encontram-se ausentes na Nova Zelândia e nas Ilhas do Pacífico (LANE, 1993).

Os dípteros do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) estão distribuídos por diversas regiões zoogeográficas do mundo, sendo representados por várias espécies encontradas em maior abundância, nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (MAROLI et al., 2013). Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* é o maior e o mais amplo geograficamente, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai (YOUNG; DUNCAN, 1994).

No Brasil, a fauna flebotomínica é composta por aproximadamente 243 espécies (GALATI et al., 2003), representando uma das faunas mais bem estudadas em todo o mundo. Isso é interessante como subsídio de informações base para desenvolvimento de políticas públicas de saúde voltadas para o programa de controle das leishmanioses (AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

No Nordeste do Brasil existe uma grande riqueza de espécies de flebotomíneos. Estados como Maranhão, Ceará e Bahia apresentam uma fauna bastante diversificada, constituída por um grande número de espécies (SHERLOCK, 1996; RÊBELO, 2000). Vários estudos sobre flebotomíneos têm sido desenvolvidos em Pernambuco, fornecendo novos conhecimentos na ecoepidemiologia das leishmanioses no Nordeste do Brasil. Um total de 37 espécies de flebotomíneos, cerca de 14 gêneros tem sido relatado previamente no estado, entretanto seis espécies necessitam de confirmação. A diversidade da fauna de flebotomíneos é pequena quando comparados com a variedade de espécies de outros estados do Nordeste, como, Maranhão e Bahia, e é mais diversa do que os estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Alagoas, Paraíba, Piauí e Sergipe (DANTAS-TORRES et al., 2010).

Em Pernambuco, a fauna flebotomínica de *Lutzomyia* ainda é pouco estudada quanto à diversidade e distribuição das espécies. Os dados disponíveis relatam o encontro de algumas espécies no município de Igarassu e na Região Metropolitana do Recife. Na Zona da Mata há apenas ocorrência de algumas espécies em área endêmica

de leishmaniose tegumentar, não sendo possível determinar com mais clareza a composição da fauna flebotomínica existente naquela área. No município de Amaraji, Zona da Mata Sul, *Lu. whitmani* apresenta predominância na fauna local, sendo a espécie predominante no ambiente peridoméstico. *Lu. complexa* foi à espécie mais importante nos ecótopos de floresta Atlântica remanescente (BRANDÃO-FILHO et al., 1999).

O estado de Pernambuco é representado por diversos biomas, sendo os principais a Mata Atlântica e a Caatinga. Porém, a diversidade das espécies de flebotomíneos na Caatinga parece ser subestimada, uma vez que tal região apresenta um ambiente hostil para espécies que não são adaptadas para sobreviver em condições semiáridas (DANTAS-TORRES et al., 2006). *Lu. longipalpis* está adaptada a estas condições extremas e por isso a leishmaniose visceral é comum no interior das regiões semiáridas de Pernambuco. *Migonemyia migonei* é um provável vetor de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), em São Vicente Ferrer, onde casos de leishmaniose visceral foram notificados (DANTAS-TORRES et al., 2010).

## 2.6 Importância das espécies de flebotomíneos na saúde pública

Diversas espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* tem grande importância na saúde pública devido à transmissão de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) agentes etiológicos das leishmanioses que são zoonoses (MARZOCHI, 1992; SHAW et al., 1987; YOUNG; DUNCAN, 1994). Além disso, os flebotomíneos são vetores de vírus, bactérias e protozoários e também afetam diretamente as pessoas, com suas picadas que causam dores e reações alérgicas (SHERLOCK, 2003; MAROLI et al., 2013).

Esses dípteros estão envolvidos na transmissão de vírus, dentre eles os mais importantes são agrupadas no gênero *Phlebovirus* (família Bunyaviridae) e no gênero *Vesiculovirus* (família Rhabdoviridae) (MAROLI et al., 2013). Nas Américas, os flebotomíneos identificados como vetores de *Phlebovirus* são: *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia panamensis* e *Lutzomyia sanguinaria* (ADLER; THEODOR, 1926). No Velho Mundo a infecção por *Phlebovirus* tem sido associada à presença de flebotomíneos no sul da

Europa, África, Oriente Médio e Ásia Central e Ocidental (TESH et al., 1976) e as espécies envolvidas são: *Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus* e *P. perfiliewi* (MAROLI et al., 2013).

Os flebotomíneos também estão envolvidos na transmissão de bartoneloses (MAROLI et al., 2013; TICONA et al., 2010). Nos humanos, tal doença provoca uma enfermidade conhecida como doença de Carrión. Este patógeno é transmitido pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (por exemplo, *Lutzomyia verrucarum* e *Lutzomyia peruensis pescei*) (SANCHEZ CLEMENTE et al., 2012), distribuindo-se na região ocidental da Cordilheira dos Andes, Equador, Colômbia e Peru, sendo relatada na Bolívia e no Chile (SANCHEZ CLEMENTE et al., 2012). Outros estudos mostram que no Peru outras espécies podem também estar envolvidas na transmissão da doença, assim como *Lutzomyia noguchii* e *Lutzomyia peruensis* (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Existem aproximadamente mais de 800 espécies de flebotomíneos, destes apenas 98 espécies de *Lutzomyia* estão comprovados com capacidade de transmitir LTA (MAROLI et al., 2013). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (RANGEL & LAINSON, 2009). O encontro de infecção natural de *Lu. neivai* (PITA-PEREIRA et al., 2009) e *Lu. fischeri* (ROCHA et al., 2010), reforçaram a suspeita de participação destas espécies na veiculação de *Leishmania* (*V. braziliensis*).

Os dados sobre a ecologia de *Lu. whitmani* são ainda incipientes, principalmente no Nordeste do Brasil, não obstante a importância da doença nessa região. A falta de conhecimento sobre a ecologia de *Lu. whitmani* limita a possibilidade de elaboração de novas medidas de controle e a elaboração de modelos preditivos que possam fornecer informações sobre as áreas e períodos de maior risco de transmissão (MIRANDA, et al., 2013).

Diferentes zoonoses assumiram um papel importante na saúde pública por causa do processo de urbanização das doenças. Isso devido às alterações no ambiente e ao movimento migratório da população da periferia para os centros urbanos. Muito embora, as taxas de incidência dessas zoonoses tenham aumentado na área urbana, não podemos afirmar que as mesmas diminuam nas áreas rurais, já que esta mantém ainda condições necessárias de prevalência dos vetores e patógenos. A leishmaniose é um excelente exemplo desse fenômeno. Esta doença, ultimamente tem se apresentado como

um importante problema de saúde pública em diversos países, não apenas por causa da invasão de área antes livres da mesma, mas também pela emergência de focos antigos da doença (GALLÉGO, 2004).

### **2.6.1 Diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.**

Diversas espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas como vetores de *Leishmania* e essa associação é feita de acordo com a espécie dominante em uma área endêmica. Os estudos de transmissão em laboratório permanecem difíceis, assim como o entendimento sobre os locais de procriação. Sem estas informações torna-se difícil determinar os fatores que definem a distribuição geográfica e ecológica de vários vetores e, conseqüentemente, da doença. Rossi et al., (2008) afirmam que estudos sobre a prevalência de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos são importantes indicadores sobre a intensidade da transmissão do parasito.

O método clássico utilizado para identificação do parasito no intestino do flebotomíneo tem sido a dissecação do trato digestório, seguido do exame microscópico direto. Neste caso, a positividade das amostras deve ser confirmada posteriormente com o isolamento do parasito em meio de cultura, que é frequentemente susceptível a contaminação, ou através de inoculação em animais de laboratório (hamster). Esta confirmação é essencial, uma vez que os flebotomíneos podem também albergar algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível de *Leishmania* spp. dificultando o diagnóstico microscópico pela semelhança (RODRIGUEZ et al., 1994; TESH; MODI, 1984). Um fator limitante para esta técnica é a dificuldade de processar grande número de espécimes capturados nas áreas de elevada transmissibilidade (ARANSAY et al., 2000; PEREZ et al., 2007), uma vez que o procedimento é laborioso e exige experiência e perícia técnica do profissional.

Outra metodologia consiste no uso de anticorpos monoclonais espécie-específicos, em ensaios imunoenzimáticos, para a identificação da espécie de *Leishmania* presente no vetor que permite a avaliação de um grande número de exemplares (ADINI et al., 1998).

Métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido frequentemente utilizados em estudos para detecção de infecção natural e têm

aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação de *Leishmania* spp., independente do número, estágio e localização do parasito no vetor (PEREZ et al., 1994). Além de possibilitar maior rapidez na análise de uma grande amostragem (BARKER, 1989; MICHALSKY et al., 2002), a técnica permite trabalhar com insetos mantidos a seco, congelados ou conservados em etanol, sem interferir no desempenho da reação (PAIVA et al., 2007).

Como métodos adicionais para caracterização molecular das espécies de *Leishmania* encontradas no vetor são utilizados as análises de polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização com sondas específicas para subgênero, complexo ou espécie, realização de um segundo ensaio de PCR com iniciadores espécie-específicos e sequenciamento (GARCIA et al., 2007; JORQUERA et al., 2005; MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2006; PITA-PEREIRA et al., 2005).

Em pesquisas recentes tem sido utilizada também a PCR em tempo real, uma técnica capaz de promover a quantificação da carga parasitária e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado para diferentes análises como em estudos de infecção natural e interação parasito-hospedeiro (GÓMEZ-SALADÍN et al., 2005; RANASINGHE et al., 2008).

## **2.7 Degradação ambiental e leishmaniose**

Segundo Dujardin (2006), fatores como o desequilíbrio socioeconômico de expressiva parcela da população, fluxos migratórios, ocupação da terra para exploração de agricultura e principalmente, a degradação contínua do ambiente são apontados como os principais responsáveis para a disseminação da leishmaniose, pois o flebotomíneo, assim como em outros ciclos endêmicos, habitava inicialmente as áreas silvestres. Migrações desordenadas em direção à floresta não apenas afetam o meio ambiente por causa do desmatamento, mas também permitem a introdução de animais, como os cães (SILVA et al., 2001).

A ação do homem sobre o ambiente ocorre de diversas maneiras, através de construções de rodovias, invasões desordenadas de áreas rurais e por meio de desmatamento para fins lucrativos. Como consequências de tais ações, podemos citar fatores que intensificam o surgimento de doenças infecciosas. Dentre esses fatores estão à fragmentação da floresta, a introdução de patógenos, a poluição e a pobreza.

Entretanto, os fatores mais importantes para a saúde pública são as alterações no ambiente físico, as migrações humanas e de patógenos, a agricultura e a urbanização (PATZ et al., 2004).

A construção de novas estradas, por exemplo, não só promove o desmatamento, mas também intensifica as atividades comerciais como a agropecuária, a mineração e a exploração de madeira. Além disso, interrompe o fluxo e altera o pH da água, causa o assoreamento e modifica o habitat e o nicho ecológico das espécies envolvidas no ciclo do parasito. As atividades de degradação em áreas nativas permitem o acesso de novas espécies alóctones de mamíferos e de vetores, bem como permitem o acesso de trabalhadores rurais e de turistas imunologicamente desprotegidos. Ao migrarem para outras áreas desmatadas ou nativas, as pessoas, os mamíferos ou ambos podem transportar parasitos que irão infectar vetores locais oferecendo condições para que novas infecções possam acontecer (PATZ et al., 2000).

A estreita relação das ações antrópicas com o crescimento de doenças tropicais, incluindo as leishmanioses, é o desmatamento de áreas nativas para fins comerciais como a pecuária, a agricultura e a exploração da madeira, ou ainda para construção de moradias de infraestrutura precária. O desmatamento provoca uma alteração ao ambiente físico através da fragmentação da floresta e apresenta como consequência dessa fragmentação a alteração no número de animais silvestres, que são fontes alimentares dos flebotomíneos. Assim, estes dípteros passam a ter outros alvos alimentares como o cão e o homem (PATZ et al., 2004).

O desmatamento e a queima da floresta alteram o clima local que afeta a população de insetos vetores de doenças infecciosas como a leishmaniose (KOVATS et al., 2001). A alteração climática pode influenciar na taxa de sobrevivência e reprodução dos vetores e como consequência, sua distribuição e abundância, além de influenciar na atividade alimentar mudando a frequência do repasto sanguíneo. Essas alterações também podem ocorrer com relação às taxas de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução do patógeno dentro dos vetores (KOVATS et al., 2001). Uma das consequências da alteração nos fatores climáticos são mudanças fisiológicas que o vetor pode sofrer, tal como um desequilíbrio hídrico. Isto pode influenciar na concordância gonotrófica, isto é, cada oviposição ser precedida por um repasto sanguíneo (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Dessa forma, algumas espécies de vetores com características antropófilas podem realizar mais de uma hematofagia, aumentando as possibilidades de

transmissão de patógenos. Trata-se, portanto, de mudança no comportamento do vetor que confere grande importância epidemiológica (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Algumas espécies de vetores podem se adaptar com muita eficiência às novas condições impostas pela degradação ambiental, é o caso da *Lu. whitmani* encontrada em maior abundância em áreas devastadas em vários períodos do ano (COSTA et al., 2007). As migrações consequentes das grandes secas no Nordeste e também aquelas que ocorreram dentro da própria região, se caracterizaram pela saída dos moradores das áreas rurais para a periferia das grandes cidades como Natal, Fortaleza, Jacobina, João Pessoa, Petrolina, São Luís, Sobral, Teresina e Salvador. Contudo, as ocupações dessas áreas se deram sem as mínimas condições sanitárias e econômicas. Isso proporcionou as condições favoráveis para o desenvolvimento da LV uma vez que os imigrantes, imunologicamente desprotegidos, além de desmatarem, trouxeram consigo vários animais domésticos que atuam como fonte alimentar para o vetor. Dentre esses animais, o cão que, além de atrair o vetor, é reservatório do agente etiológico (WHO, 2002).

Pesquisa desenvolvida ao norte do Rio Amazonas, nos municípios de Silves e Itacoatiara, no estado do Amazonas, mostrou que o número de flebotomos fêmeas infectados diminuiu em consequência da exploração de madeira naquela área. Uma hipótese é que o desmatamento teria causado a morte imediata de muitos espécimes, e provocado à migração para locais próximos que ofereciam melhores condições de sobrevivência para os flebotomos. Uma hipótese alternativa é que esta prática ao afetar o habitat de muitos vertebrados, que são fonte alimentar desses vetores, induziu-lhes à migração forçada para outras áreas (PESSOA et al., 2007).

A incidência da LTA na região Nordeste é verificada tanto nas áreas com resquícios de floresta de Mata Atlântica, nas quais se verifica vegetação abundante, como em áreas com predominância de mata secundária e diversos tipos de plantações, propícias à colonização dos flebotomíneos e mamíferos silvestres e sinantrópicos, mas também em regiões desmatadas, com adaptação de vetores e reservatórios à ambientes modificados, com transmissão peridomiciliar (MARZOCHI, 1992). A infecção atinge mulheres, crianças e, principalmente, adultos do sexo masculino, em alguns casos, todos os indivíduos de uma mesma família são acometidos pela doença (BRANDÃO-FILHO et al., 1999).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Estudar a ecologia de flebotomíneos em uma área rural endêmica para leishmaniose tegumentar americana no estado de Pernambuco.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Descrever as espécies que compõem a fauna de flebotomíneos em uma área de Mata Atlântica no município de Ipojuca;
- Estudar a dinâmica sazonal de flebotomíneos em área de Mata Atlântica em Ipojuca;
- Avaliar a relação entre fatores climáticos e a dinâmica diária e mensal de flebotomíneos em Ipojuca;
- Identificar a taxa de flebotomíneos infectados por *L. braziliensis* através de biologia molecular.



#### 4. REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (Eds). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. Cap. 3, p. 207-256.

ADINI, I.; JACOBSON, R. L.; KASAP, M.; SCHLEIN, Y.; JAFFE, C. L. Species-specific detection of *Leishmania* in sand flies using an enzymed-linked immunosorbent assay. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v. 92, p. 35-37, 1998.

ADLER, S.; THEODOR, O. On the minutus group of the genus *Phlebotomus* in Palestine. **Bulletin of Entomological Research**, v. 16, n. 4, p. 399-405, 1926.

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós colombianas. **História, Ciências e Saúde – Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853-882, 2003.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, 356–371, 2012.

ANDRADE, A. J.; ANDRADE, M. R.; DIAS, E. S.; PINTO, M. C.; EIRAS, A. E. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 337-343, 2008.

ARAGÃO, H. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **O Brasil Médico**, v.36, p. 129, 1922.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, p.1933–1938, 2000.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; BRITO, M. E. F.; SHAW, J.J.; DAVIES, C.R. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; DONALISIO, M.R.; DA SILVA, F.J.; VALENÇA, H.F.; COSTA, P.L.; SHAW, J. J.; PETERSON, A.T. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n.1, p.71-76, 2011.

BARKER, D. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v. 99: 129-146, 1989.

BRASIL. Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle de LTA**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2000.

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

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia: Biologia de flebotomíneos neotropicais. *In*: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 257-269.

BRÜCKER, G.; GENTILINI, M. **Las Leishmaniasis en América Latina**. La Fondation Rhône-Poulenc Snaté, Paris, p. 30, 1987.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; PINTO, M. C.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SOUZA, A. A.; READY P. D.; DAVIES, C. R. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, p. 299–309, 1999.

COLWELL, D. D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14-21, 2011.

COQUILLET, D. W. Discovery of blood sucking Psychodidae in America. **Entomological News**, v. 18, p. 101-102, 1907.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s. I. Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 149-153, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p.352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; ANDRADE, A.J. DA; TENÓRIO, K.E.; ANDRADE, J.D.F.; BALBINO, V.Q.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.6, p. 733-739, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V.M.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine Leshmaniosis in the old new

worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n.12, p. 531-538, 2012.

DEDET, J. P.; VIGNES, R.; RANGEL, E. F. Morfologia e taxonomia: grupo CIPA. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 177-184.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n.3, p. 239-43, 2001.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 4-6, 2006.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.

FERRO, C.; PARDO, R.; TORRES, M.; MORRISON, A.C. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 719-728, 1997.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v. 4, p. 658.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; NAUFEL, G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 2, p. 283-296, 2003.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.23, p. 661-676, 2004.

GARCIA, A.L.; TELLEZ, T.; PARRADO, R.; ROJAS, E.; BERMUDEZ, H.; DUJARDIN, J.C. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a periodomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 1208–1213, 2007.

GÓMEZ-SALADÍN, E.; DOUD, C.W.; MAROLI, M. Short report: surveillance of *Leishmania* spp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 138–141, 2005.

JORQUERA, A.; GONZÁLEZ, R.; MARCHÁN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n.1, p. 45–48, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sandflies. **Clinics in Dermatology**, v.17, p. 279–289, 1999.

KOVATS, R.S.; LENDRUM, D.H.C.; McMICHAEL, A.J.; WOODWARD, A. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? **The Royal Society London**, v. 356, p. 1057–1068, 2001.

LANE, R.P. Sandflies (Phlebotominae). **Medical Insects and Arachnids** (ed. by R. P. Lane & R. W. Crosskey), p. 78–119. Chapman & Hall, London, 1993.

LEWIS, D. F. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology)**, v. 45, p. 121–209, 1982.

LEWIS, D. J.; YOUNG, D.G.; FAIRCHILD, G. B.; MINTER, D. M. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**, v. 2, n. 4, p. 319-332, 1977.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 1912.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001, 432p.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n.2, p. 123-47, 2013.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; GÁLLEGO, M.; BARÓN, S.; CASTILLEJO, S.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 527-532, 2006.

MARTINS, A. V.; WILLIAMIS, P. FALCÃO, A. L. American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). 1. ed. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**. 195p. 1978.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, n. 5-6, p. 82-104, 1992.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; NÁGILA F.C. SECUNDINO, N.F.C.; S. DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 255- 259, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde. 122 p. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf). Acesso em: 16 de maio de 2014.

MIRANDA, D. E. O.; DA SILVA, C. M.; DA SILVA, G. R.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; DANTAS-TORRES, F.; CARVALHO, G. A. **Presença de *Lutzomyia whitmani* no município de Ipojuca, Pernambuco, Brasil**. In: XIII Jornada de Ensino Pesquisa, Pernambuco, Recife. *Resumos...* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.

MONTOYA-LERMA, J. Autogeny in the tropical sand fly *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 29, p. 698-699, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Essential leishmaniasis maps**. Geneva, 2010. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/). Acesso em: 19 mar. 2014.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JR, H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n.1, p. 87–94, 2007.

PATZ, J.A.; DASZAK, P.; TABOR, G.M.; AGUIRRE, A.A.; PEARL, N.D.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N.D.; KILPATRICK, A.M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.;

BRADLEY, D.J. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental Health Perspectives**, v.112, p.1092-1098, 2004.

PATZ, J.A., GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITOR, A. Effects of environmental changes on emerging parasitic disease. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395-405, 2000.

PEREZ, J. E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.;PAZ, L.; NIETO, E.; AREVALO, J.; GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v. 88, p. 1614, 1994.

PEREZ, J. E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.;PAZ, L.; NIETO, E.;AREVALO, J.; GUERRA, H. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) peruviana from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 655-658, 2007.

PESSOA, F.A.C.; MEDEIROS, J.F.; BARRETT, T.V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 593-599, 2007.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente de *Leishmania braziliensis*. **Acta Médica**, v. 5, p. 106-111, 1940.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.R.; SOUZA, M.B.; BRAZIL, R.P.; BERTHO, A.L.; BARBOSA, A.F.; BRITTO, C.C. 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.



**Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 99, n.12, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G.D.; ZWETSCH, A.; ALVES, C.R.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.C.; BATES, P.A.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.875–882, 2008.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, , 2003, p. 291-309.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.7, n.104, p. 937-54, 2009.

READY, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveillance**, v.15, p. 1-11, 2010.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I – Riqueza e abundancia relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 11-19, 2000.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 349 p.

ROCHA, L.S.; FALQUETO, A.; SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; GRAÇA, G. C.; JÚNIOR, G. G.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 461-466, 2010.

RODRIGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; B R BLOOM, B.R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 2246-2252, 1994.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1261-1262, 1903.

ROSSI, E.; BONGIORNO, G.; CIOLLI, E.; DI MUCCIO, T.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; MAROLI, M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a highendemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropica**, v. 105, p.158–165, 2008.

SANCHEZ CLEMENTE, N.; UGARTE-GIL, C.A.; SOLÓRZANO, N. Bartonella bacilliformis: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p.18-19, 2012.

SHAW, J.J.; LAINSON, R.; RYAN, L.; BRAGA, R. R.; MCMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. R. Leishmaniasis in Brazil XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis* in wild-caught sandflies, using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.81, n.1, p. 69-72, 1987.

SHERLOCK, I. A. Importância médico-veterinária: A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 15-21.

SHERLOCK, I.A.; MAIA, H.; DIAS-LIMA, A. G. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores da leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 207-214, 1996.

SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V. A. Criação e biologia, em laboratório, do “*Phlebotomus longipalpis*” Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.19, n.3, p. 229-250, 1959.

SILVA, A. C.; GOMES, A. C. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912), para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 187-191, 2001.

TARALLO, V.D.; DANTAS-TORRES, F.; LIA, R.P.; OTRANTO, D. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. **Acta Tropica**, v.3, p. 227-234, 2010.

TAUIL, P. L. Controle de doenças transmitidas por vetores no Sistema Único de Saúde. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 59-60, 2002.

TESH, R.B.; MODI, G. B. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, p. 41-46, 1984.

TESH, R.B.; SAIDI, S.; GAJDAMOVIC, S.J.; RODHAIN, F.; VESENJAK-HIRJAN, J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 54, p. 663–674, 1976.

THEODOR, O. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Bulletin of Entomological Research**, n. 39, p. 85-115, 1948.

TICONA, E.; HUAROTO, L.; GARCIA, Y.; VARGAS, L.; MADARIAGA, M.G.. The pathophysiology of the acute phase of human bartonellosis resembles aids. **Medical Hypotheses**, v. 74, n. 1, p. 45-49, 2010.

World Health Organization (2010). Control of the leishmaniasis. **Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, 22–26 March 2010, WHO Technical Report Series. WHO, Geneva.

World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly epidemiological record**, v. 44, p. 365-372, 2002.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E.G. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n.4, p. 427-432, 1999.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v.54, p. 1-881, 1994.

**5. ARTIGO**

### **5.1 Artigo**

**(Artigo submetido à Revista Acta Tropica)**

**Formatado conforme as normas da Revista**

**ECOLOGY OF SAND FLIES IN A LOW-DENSITY RESIDENTIAL RURAL  
AREA WITH MIXED FOREST/AGRICULTURAL EXPLOITATION, IN  
NORTHEASTERN BRAZIL**

**ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS EM UMA ÁREA RURAL DE BAIXA  
DENSIDADE RESIDENCIAL COM EXPLORAÇÃO MISTA DE FLORESTA E  
AGRICULTURA, NO NORDESTE DO BRASIL**

## **Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil**

### **Abstract**

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* is endemic in Brazil, where *Lutzomyia whitmani* is the most important vector involved in the transmission to humans, particularly in the peridomestic environment. Herein, we assessed the ecology of sand flies, including *Lu. whitmani*, in a low-density residential rural area with mixed forest/agricultural exploitation in north-eastern Brazil, where cutaneous leishmaniasis is endemic. Particularly, we hypothesized that sand fly abundance was correlated with climatic variables. Sand fly collections were carried out monthly from August 2013 to August 2014, using seven CDC light traps, for three consecutive nights, in three kinds of environments: indoor, peridomestic and forest. Collected sand flies were identified based on morphology and females of *Lu. whitmani* ( $n = 169$ ), *Lu. amazonensis* ( $n = 134$ ) and *Lu. complexa* ( $n = 21$ ) were selected and tested by PCR for *Leishmania* (*Viannia*) spp. In total, 5,167 sand flies belonging to 19 species were identified, being that *Lu. choti* (43.2%) was the most frequent species, followed by *Lu. amazonensis* (16.6%), *Lu. whitmani* (15.8%), *Lu. sordellii* (10.7%) and *Lu. quinquefer* (5.8%), which together represented over 90% of the collected sand flies. All females tested by PCR were negative. The number of sand flies collected daily was positively correlated with temperature and negatively correlated with rainfall and relative humidity. Furthermore, there was a positive correlation between daily number of sand flies and daily average saturation deficit. This study points out that the number of sand flies captured daily is correlated to climatic variables, including saturation deficit, which may represent a useful parameter for monitoring sand fly populations in leishmaniasis-endemic areas.

**Keywords:** *Lutzomyia whitmani*, ecology, cutaneous leishmaniasis, epidemiology.

## 1. Introduction

Phlebotomine (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are vectors of numerous pathogens to animals and humans (Maroli et al., 2013). In particular, they are the principal vectors of *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the causative agents of leishmaniasis, a group of diseases affecting annually over 1 million people in 98 countries (Alvar et al., 2012).

About 56 species of sand flies have been proven or suspected to transmit *Leishmania* parasites in the New World (Maroli et al., 2013). The distribution and transmission dynamics of leishmaniasis are directly related to the presence and abundance of sand fly vector populations. Thus, understanding the ecology of these insects is important for refining the control strategies (e.g., insecticide spraying) currently in place.

In Brazil, one of the largest foci of leishmaniasis in the world (Alvar et al., 2012), several sand fly species are involved in the transmission of *Leishmania* spp. to humans, including are *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia complexa* and *Lutzomyia longipalpis* (Rangel and Lainson, 2009; Maroli et al., 2013). Annually, near 30000 cases of cutaneous leishmaniasis are notified to public health authorities and the majority of them are caused by *Leishmania braziliensis*. Different sand fly species have been implicated in the transmission of *L. braziliensis*, including *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, *Lu. complexa*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia fischeri* and *Lutzomyia migonei* (Alvar et al., 2012; Maroli et al., 2013).

In different foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Le. braziliensis* in Brazil, *Lu. whitmani* is the principal vector involved in the transmission to humans, particularly in the peridomestic environment, where this sand fly is mainly found nearby domestic



animal shelters or in crop plantations (Rangel and Lainson, 2009). Nonetheless, the knowledge on the ecology of this important vector remains fragmentary and this may impair the establishment of effective control strategies, as basic information on the abundance and seasonal dynamics of any sand fly species is fundamental to decide which strategy to use, and where and when apply it. Furthermore, studies conducted in different Brazilian regions have indicated some differences in the ecological behaviour of *Lu. whitmani* (Ready et al., 1998; Campbell-Lendrum et al., 1999a,b,2000), with some populations being associated to primary and secondary forests and others being more adapted to human-modified environments (Costa et al., 2007; Rangel and Lainson, 2009). In the present study, we assessed the ecology of sand flies, including *Lu. whitmani*, in a low-density residential rural area with mixed forest/agricultural exploitation in north-eastern Brazil, where cutaneous leishmaniasis by *L. braziliensis* is endemic. In particular, we hypothesized that the abundance of sand flies was correlated with climatic variables, such as temperature and relative humidity.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Study area*

The municipality of Ipojuca (08°23'56"S, 35°03'50") is located in the Metropolitan region of Recife, Pernambuco State, north-eastern Brazil. The climate is tropical with dry summer. The raining period starts in December/January and lasts until September, with annual average temperature of 26°C (range, 25–27°C) and average relative humidity of 78% (range, 74–82%). The vegetation is predominantly represented by the Atlantic forest and the municipality is crossed by the Ipojuca River. The specific area chosen for this study was a rural area dominated by sugar cane plantations with some remnants of Atlantic forest (Fig. 1). The municipality is also an important industrial

pole in Pernambuco, whose activities are mainly concentrated in the port of Suape and its surrounding industrial district.

According to the Information System on Disease Notification (SINAN), 32 human cases of CL were reported in Ipojuca between 2009 and May 2014. Incidentally, little information is available on the sand fly fauna and species of *Leishmania* circulating in sand flies, animals and humans in Ipojuca.

## 2.2. Collection and identification of sand flies

Sand fly collections were carried out from August 2013 to August 2014, in a locality known as “Engenho Fortaleza”. Seven CDC light traps were installed monthly, for three consecutive nights, from 5:00 pm to 6:00 am. Each trap was positioned at 1.5 m above the ground, in three kinds of environments: indoor, peridomicile and forest (Table 1). In the forest, collection sites were typically near animal burrows, trunks of large trees, shaded and humid areas. All traps were placed on trees, except the ones from the sites 1 and 5, which were placed on the inner wall of a house and on the roof of a horse stable, respectively.

The collected specimens were kept in 70% ethanol and later identified using morphological keys for American sand flies (Young and Duncan, 1994). The thorax and abdomen (excluding the last three segments that were used for morphological identification) of selected females were separated and kept in 70% ethanol until DNA extraction and PCR testing.

## 2.3. DNA extraction and PCR testing

DNA was individually extracted from 324 specimens belonging to three species: *Lu. whitmani* (n=169), *Lu. amazonensis* (n=134) and *Lu. complexa* (n=21). DNA was

extracted using Chelex 100<sup>®</sup>, as described elsewhere (Coombs et al., 1999). In brief, 100 µl of 5% Chelex 100<sup>®</sup> (diluted with DNA free water) was added to each 1.5 ml tube containing each individual female sand fly. The specimens were macerated and left at 56°C for 1 h. After that, the material was transferred to a 2 ml tube and left at 94°C for 30 min. Finally, these tubes were centrifuged at 15.000 g for 6 min and the supernatant was collected and transferred to clean tubes, which were frozen at -20°C.

Extracted DNA samples were tested and subjected to PCR amplification. We used the primers B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') and B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), which target the conserved region of kinetoplast minicircle *Leishmania (Viannia)* spp. DNA (Bruijn and Barker, 1992). PCR reactions were run performed in a 25 µL volume containing 14 µl of water type I, 2.5 µl of dNTP (2 mM), 0.5 µl of *Taq* DNA Polimerase (5 U/µl), 1.5 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.5 µl of 10 x PCR buffer, 2.5 µl each primer (100 pmol/µl) (Invitrogen) and 2 µl of the template DNA. The amplification conditions consisted of 35 cycles (94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 1 min), preceded by an initial denaturation step of 5 min at 94°C. Positive (DNA from cultured promatigotes) and negative (DNA extracted from male sand flies) controls were included in each PCR run. The products were analyzed in 1.5% agarose gels, being stained with ethidium bromide (10 µg/ml) and visualized under a UV transilluminator, using 100 bp DNA ladder (Invitrogen) as a molecular weight marker.

#### 2.4. Meteorological data

Data on monthly average temperature (°C), relative humidity (%) and rainfall (mm<sup>3</sup>) for the whole period of study were provided by the Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). The saturation deficit (SD) was calculated as follows:  $SD = (1 -$

$\text{RH}/100) \times 4.9463 \times e^{0.0621 \times T}$ , where RH is relative humidity and T is temperature (Otranto and Dantas-Torres, 2013).

### 2.5. Diversity indices and abundance

Diversity indices were calculated using PAST version 2.16 (Hammer et al., 2001). In particular, we considered the number of taxa (S), number of individuals ( $n$ ), Shannon's diversity index ( $H'$ ) and Pielou's equitability index ( $J'$ ). The standardized index of species abundance (SISA) was calculated as described elsewhere (Roberts and Hsi, 1979).

### 2.6. Data analysis

Normality of data was assessed using Lilliefors test using BioEstat software, version 5.3 (Ayres et al., 2000). Then, correlation between climatic variables and the number of specimens collected monthly was assessed using Pearson's ( $r$ ) or Spearman's ( $r_s$ ) correlation coefficients, as appropriate. The number of sand flies of each species collected according to months or collection sites was compared using Kruskal-Wallis. The significance level was 5%. Statistical analyses were performed using BioEstat software, version 5.3 (Ayres et al., 2000).

## 3. Results

In total, 5,167 sand flies were collected from 39 actual nights and 273 trap-nights, yielding 19 sand flies per trap-night. Nineteen species of sand flies were identified (Table 2), being that *Lu. choti* (43.2%) was the most frequently collected species, followed by *Lu. amazonensis* (16.6%), *Lu. whitmani* (15.8%), *Lu. sordellii* (10.7%) and *Lu. quinquefer* (5.8%), which together represented over 90% of the collected sand flies.

According to the standardized index of species abundance (see Table 2), *Lu. choti* was the most abundant species in the study, followed by *Lu. sordellii*, *Lu. quinquefer*, *Lu. evandroi*, *Lu. longispina*, *Lu. whitmani* and *Lu. amazonensis*.

In general, number of males (53.2%) was roughly equivalent to the number of females (46.8%), with sex ratio of 1.1:1. A strong positive correlation between the monthly number of males and females collected during the study ( $r = 0.7493$ ;  $P = 0.0032$ ) was observed. No statistically significant difference was found between the number of males and females collected monthly, either in general or according to species (data not shown).

Sand flies were present during all months of the study, being more numerous in November ( $n = 793$ ) and December 2013 ( $n = 807$ ) (Fig. 2), when the temperature and relative humidity ranged from 26°C to 27°C and from 74% to 77%, respectively. There was no significant correlation between the number of sand flies collected monthly and the climate variables. However, the number of sand flies collected monthly tended to be negatively correlated with monthly average rainfall ( $r = -0.2027$ ,  $P = 0.5066$ ) and relative air humidity ( $r = -0.3976$ ,  $P = 0.1784$ ) and positively correlated with temperature ( $r = 0.4619$ ,  $P = 0.112$ ). This tendency was confirmed using daily data, that is, the number of sand flies collected daily was positively correlated with temperature ( $r_s = 0.5971$ ,  $P < 0.0001$ ) and negatively correlated with rainfall ( $r_s = -0.5936$ ,  $P < 0.0001$ ) and relative humidity ( $r_s = -0.4310$ ,  $P = 0.0061$ ) (Fig. 4)..

No significant correlation was found between the number of sand flies collected monthly and the monthly average saturation deficit ( $r = 0.5170$ ,  $P = 0.0703$ ), but the trend was towards a positive relationship between these variables. Indeed, considering daily data, there was a positive correlation between daily number of sand flies collected and daily average saturation deficit ( $r = 0.4821$ ,  $P = 0.0019$ ).

The monthly number of sand flies collected varied according to collection site (Kruskal-Wallis,  $P < 0.0001$ ). In particular, most of the sand flies were collected in two sites, being one in the forest (site 3; 30.7%) and other in a horse stable (site 5; 27.6%) (Fig. 3).

*Lutzomyia choti*, *Lu. amazonensis* and *Lu. whitmani* were the species most frequently collected in the study. In particular, most specimens of *Lu. choti* (1387 out of 2232) were collected in the forest, and occurred with *Lu. amazonensis* (857 out of 859). On the other hand, *Lu. whitmani* was most frequently collected in the peridomicile (806 out of 815), particularly, in the horse stable ( $n = 584$ ).

The diversity of sand flies varied according to the collection site (Table 3). The highest species richness was found in three collection sites (sites, 3, 4 and 6), corresponding to forest areas. Secondly, a relatively high number of species was found in three sites, corresponding to a horse stable (site 5) and two trees (sites 2 and 7) located in the peridomiciliary area of three houses nearby the forest. Interestingly, six species were found in all collection sites, i.e., *Lu. choti*, *Lu. longispina*, *Lu. sordellii*, *Lu. whitmani*, *Lu. evandroi* and *Lu. quinquefer*. The species diversity ( $H'$ ) was greater in the collection sites 7, 4 and 6, respectively, whereas the equitability ( $J'$ ) was greater in the sites 7, 1 and 6, indicating that individual sand flies were more equitably distributed among different species in these collection sites (Table 3).

In total, 324 females of *Lu. whitmani* ( $n = 169$ ), *Lu. amazonensis* ( $n = 134$ ) and *Lu. complexa* ( $n = 21$ ) were individually tested by PCR for *Leishmania* (*Viannia*) spp., but all of them were negative.

#### 4. Discussion

In the present study, the ecology of *Lu. whitmani* and other sand fly species was assessed in a low-density residential rural area with mixed forest/agricultural exploitation in north-eastern Brazil, mainly characterized by the presence of sugar cane plantations and fragments of Atlantic rainforest. The main climatic feature of this area is its elevated annual rainfall average. We hypothesized that the abundance of sand flies was correlated with climatic variables. Indeed, the number of sand flies collected daily was positively correlated with temperature and negatively correlated with rainfall and relative humidity. We also found a positive correlation between daily number of sand flies collected and daily average saturation deficit. These findings suggest that even in areas where the climatic variables remain more or less constant during the whole year, the sand fly population dynamics is still influenced by climatic variables, such as rainfall.

It is acknowledged that sand flies are influenced by climate and other factors (Tarallo et al., 2010; Costa et al., 2013; Gaglio et al., 2014), such as host presence and landscape features (e.g., vegetation coverage). A recent research conducted in southern Italy also suggested the usefulness of saturation deficit for studies on sand fly ecology (Dantas-Torres et al., 2014). This index is frequently used in studies on tick ecology. Interestingly, the abundance of ticks is negatively correlated with saturation deficit. Saturation deficit (a measure of the drying power of the air, defined as the difference in vapour pressure between the saturation and actual water vapour pressure) increases with warmer drier weather, which adversely affects the questing activity of ticks, such as *Ixodes ricinus* (Knap et al., 2009; Dantas-Torres and Otranto, 2013). On the other hand, the relationship between sand flies and the saturation deficit appears to be the exactly the opposite (Dantas-Torres et al., 2014; present study). In Europe, the sand fly season

begins in late spring and lasts until autumn factors (Tarallo et al., 2010; Dantas-Torres et al., 2014; Gaglio et al., 2014). During this period the dry and hot climate favour the abundance of sand flies. In our study area, the positive correlation between daily number of sand flies collected and daily average saturation deficit may be explained by the lower number of sand flies collected during rainy nights (=low saturation deficit). Further studies are advocated to evaluate the threshold above which the sand fly population peaks up. This threshold value would be useful for sand fly population monitoring in areas of *Leishmania* transmission.

*Lutzomyia choti* was the dominant species in this study. There is little information on this sand fly species, mainly regarding its avidity for human hosts and role in *Leishmania* transmission. Nonetheless, this sand fly is frequently found in high numbers in remnants of Atlantic rainforest in Pernambuco (Andrade et al., 2005; Silva and Vasconcelos, 2005), where *L. braziliensis* transmission occurs. Furthermore, in a study conducted in an area of Atlantic rainforest in Pernambuco, several specimens of *Lu. choti* were attracted to human baits (Balbino et al., 2005), which may suggest its attractiveness to this host. Additional studies would be valuable to assess the host range and the infection by *Leishmania* parasites of this sand fly in areas of *L. braziliensis* transmission.

Some species (i.e., *Lu. choti*, *Lu. longispina*, *Lu. sordellii*, *Lu. whitmani*, *Lu. evandroi* and *Lu. quinquefer*) found in this study were collected in all environments studied. It may indicate their adaptability to human dwellings, but we should emphasize that most of the houses investigated were nearby fragments of Atlantic rainforest. In this scenario, the control of sand flies in the houses may be troublesome as the forest will act as *refugia* for forest-adapted species. As a consequence, the houses treated with insecticides will tend to be re-infested as soon as the control measures are interrupted.



None of the females tested for *Leishmania* was DNA-positive, although cutaneous leishmaniasis is endemic in the study area. The usually low infection rate in sand flies is acknowledged (Oliveira-Pereira et al., 2006; Neitzke et al., 2008; Rocha et al., 2010). For instance, in a study conducted in Paraná, southern Brazil, only one female of *Lu. whitmani* was infected among 2487 dissected, being all specimens PCR-negative (Neitzke et al., 2008). The relatively low number of specimens tested by PCR may also have reduced the likelihood of finding a positive female in this study. As such, these negative results do not rule out the involvement of these species in the transmission of *L. braziliensis*, particularly because *Lu. whitmani* and *Lu. complexa* have been incriminated as vectors of this parasite in Brazil (Rangel and Lainson, 2009).

A previous study demonstrated that *Lu. whitmani* was mainly found with peridomiciliary locations and associated negatively with denser vegetation areas (Donalisio et al., 2012). The present study reinforces this assertion and further indicates that *Lu. whitmani* is mainly found in the peridomestic environment, even in low-density residential rural areas with mixed forest/agricultural exploitation. It also indicates that in these areas, forest-adapted sand fly species may be found in peridomiciliary locations, as the houses are frequently constructed nearby the forest. Finally, it points out that the number of sand flies (including *Lu. whitmani*) captured daily is significantly correlated to climatic variables, including saturation deficit, which may represent a useful parameter for studying of sand fly populations in leishmaniasis-endemic areas.

### **Acknowledgements**

Thanks to the Municipal Secretary of Health of Ipojuca and to the community “Engenho Fortaleza” for their support during the collections. This article is based on the Master of Science dissertation (Programa de Ps-graduao em Ciência Animal

Tropical) of the first author, developed at the Universidade Federal Rural de Pernambuco, with support from a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This work was partially supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., 2012. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7, 356–371.
- Andrade, M.S, Valença, H.F., da Silva, A.L., Almeida, F.A., Almeida, E.L., de Brito, M.E., Brandão-Filho, S.P., 2005. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cad. Saude Publica*. 21, 1761–1767.
- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D.L., Santos, A.L., 2000. *BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Manuas: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 272.
- Balbino, V.Q., Coutinho-Abreu, I.V., Sonoda, I.V., Marques da Silva, W., Marcondes, C.B., 2005. 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. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 99, 683–693.
- Bruijn, M. H. L., Barker, D. C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 52, 45–58.

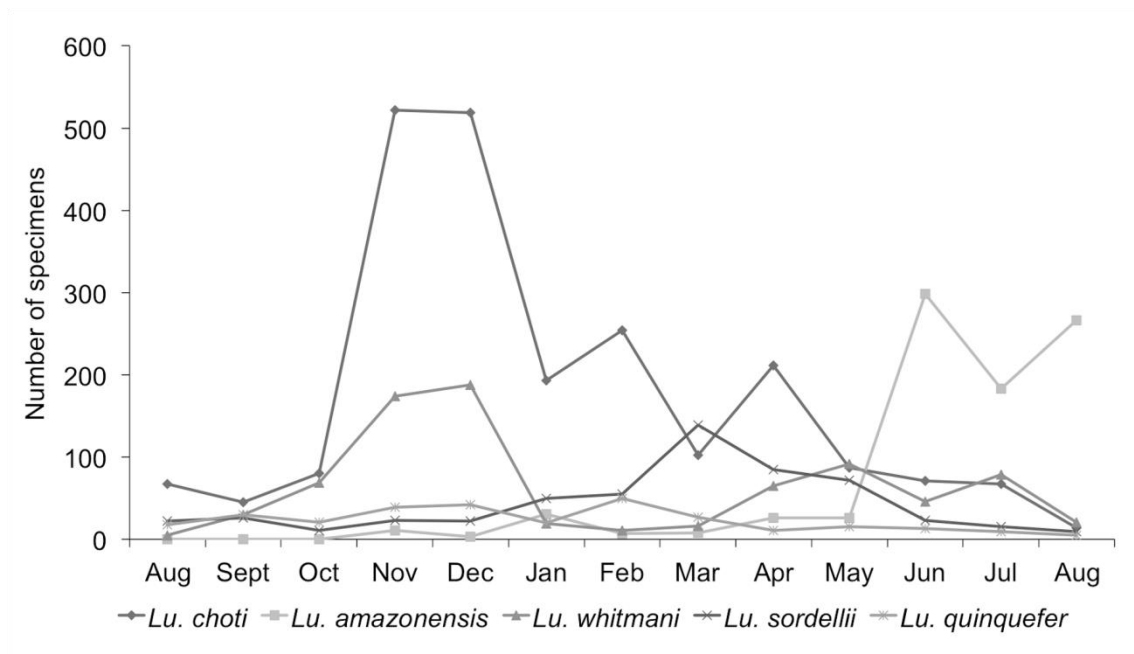
- Campbell-Lendrum, D., Pinto, M.C., Davies, C., 1999a. Is *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) more endophagic than *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) because it is more attracted to light? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94, 21–22.
- Campbell-Lendrum, D.H., Brandão-Filho, S.P., Pinto, M.C., Vexenat, A., Ready, P.D., Davies, C.R., 2000. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. Bull. Entomol. Res. 90, 41–48.
- Campbell-Lendrum, D.H., Brandão-Filho, S.P., Ready, P.D., Davies, C.R., 1999b. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. Med. Vet. Entomol. 13, 209–211.
- Campbell-Lendrum, D.H., Pinto, M.C., Brandão-Filho, S.P., de Souza, A.A., Ready, P.D., Davies, C.R., 1999c. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). Med. Vet. Entomol. 13, 299–309.
- Coombs, N.J., Gough, A.C., Primrose, J.N., 1999. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res. 27, 1–12.
- Costa, P.L., Dantas-Torres, F., da Silva, F.J., Guimarães, V.C., Gaudêncio, K., Brandão-Filho, S.P., 2013. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. Acta Trop. 126, 99–102.
- Costa, S.M., Cechinel, M., Bandeira, V., Zannuncio, J.C., Lainson, R., Rangel, E.F., 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil-mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102, 149–153.

- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Species diversity and abundance of ticks in three habitats in southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 251–255.
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Latrofa, M.S., Falchi, A., Lia, R.P., Otranto, D., 2014. Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. *Acta Trop.* 137, 67–73.
- Donalisio, M.R., Peterson, A.T., Costa, P.L., da Silva, F.J., Valença, H.F., Shaw, J.J., Brandão-Filho, S.P., 2012. Microspatial distributional patterns of vectors of cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, northeastern Brazil. *J. Trop. Med.* 2012, 1–8.
- Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsone, L., Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D., Giannetto, S., 2014. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 133, 73–77.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Palaeontological Statistics Soft-ware Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9.
- Knap, N., Durmisi, E., Saksida, A., Korva, M., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Vet. Parasitol.* 164, 275–281.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27, 123–147.
- Neitzke, H.C., Scodro, R.B., Castro, K.R., Sversutti, A. de C., Silveira, T.G., Teodoro, U., 2008. [Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41,17–22.

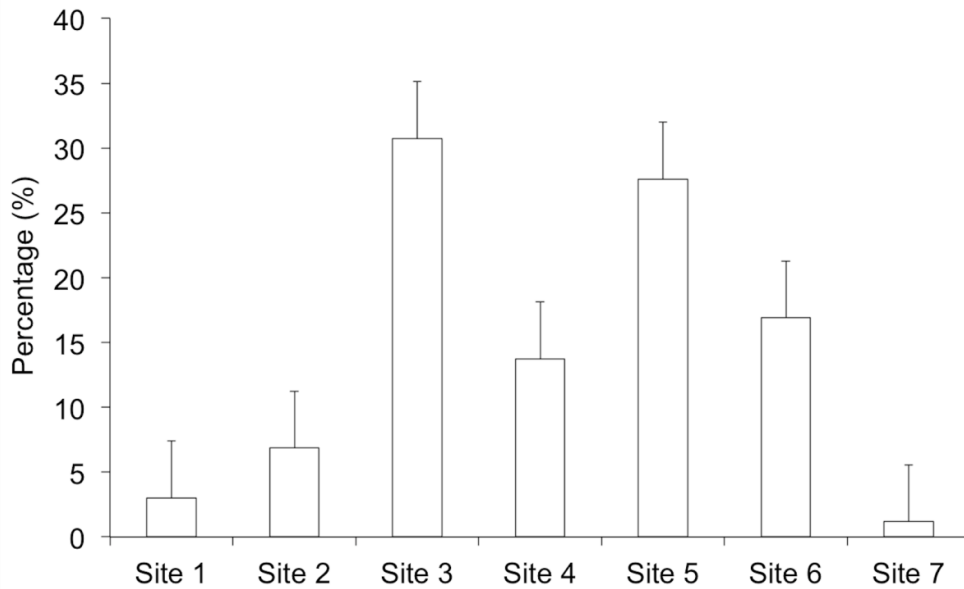
- Oliveira-Pereira, Y.N., Rebêlo, J.M.M., Moraes, J.L.P., Pereira, S.R.F., 2006. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39, 540–543.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104, 937–954.
- Ready, P.D., de Souza, A.A., Rebelo, J.M., Day, J.C., Silveira, F.T., Campbell-Lendrum, D., Davies, C.R., Costa, J.M., 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the southeast boundary of Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92, 159–160.
- Roberts, D.R., Hsi, B.P., 1979. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. Environ. Entomol. 8, 1007–1013.
- Rocha, L.S., Falqueto, A., dos Santos, C.B., Ferreira, A.L., da Graça, G.C., Grimaldi, G. Jr., Cupolillo, E., 2010. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 104, 461–466.
- Silva, D. F., Vasconcelos, S.D., 2005. [Phlebotomine sandflies in fragments of rain forest in Recife, Pernambuco State]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 264–266.
- Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Otranto, D., 2010. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. Acta Trop. 116, 227–234.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. Am. Entomol. Inst. 54, 1–881.



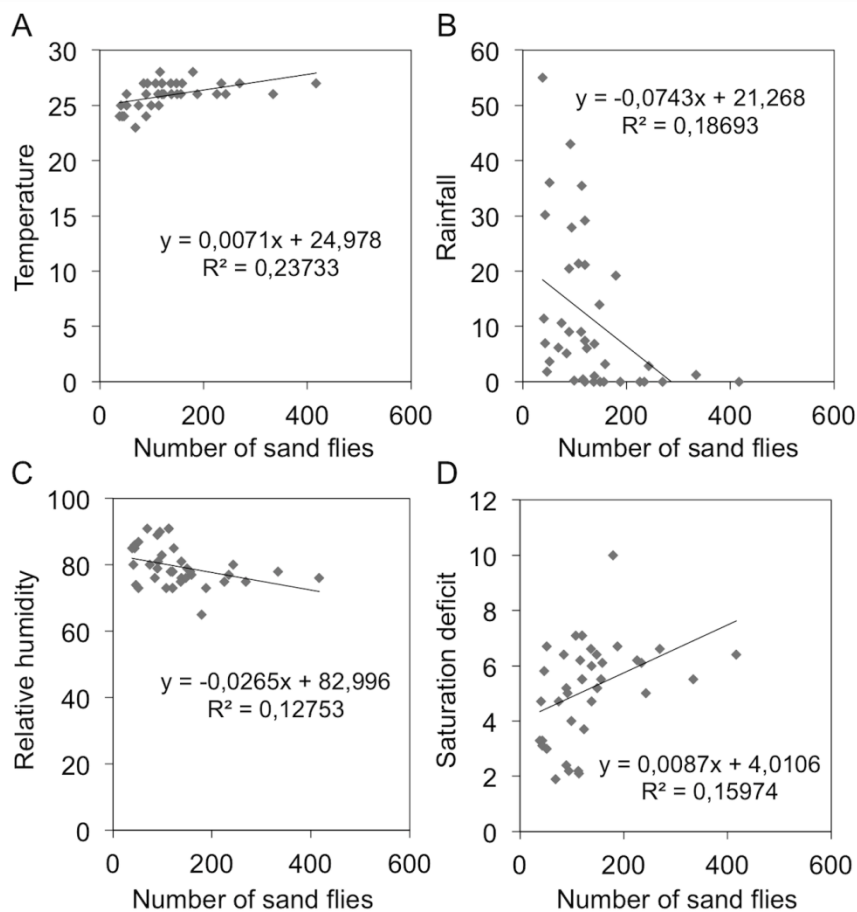
**Figure 1.** Predominant landscapes of the study area: Atlantic rainforest (A) and sugar cane plantations (B).



**Figure 2.** Number of specimens collected according to month of collection. Only the five most abundant species are shown.



**Figure 3.** Percentage of sand flies collected according to collection site.



**Figure 4.** Correlation between daily number of sand flies collected and temperature (A), rainfall (B), relative humidity (C) and saturation deficit (D).

**Table 1**

Coordinates and description of the collection sites included in this study.

Site	Coordinates	Altitude	Description	Presence of animals near to the traps?
Site 1	08° 23' 10" S 35° 10' 46" W	152 m	Inside of a house	Dogs and cats
Site 2	08° 23' 08" S 35° 10' 47" W	155 m	Tree near the house	Chickens, dogs and cats
Site 3	08° 23' 07" S 35° 10' 44" W	149 m	Forest	Animal burrows <sup>a</sup>
Site 4	08° 23' 02" S 35° 10' 49" W	115 m	Forest	Animal burrows <sup>a</sup>
Site 5	08° 23' 00" S 35° 10' 44" W	123 m	Horse stable near a house	Dogs, cats and horses
Site 6	8° 22' 55" S 35° 10' 36" W	143 m	Forest	Animal burrow <sup>a</sup>
Site 7	8° 22' 50" S 35° 10' 45" W	117 m	Tree near the house	Chickens, dogs and cats



**Table 2**

Sand fly species collected according to sex and collection sites, 2013–2014, Pernambuco, north-eastern Brazil. The standardized index of species abundance (SISA) is also provided.

Species	Males	Females	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6	Site 7	SISA
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
<i>Lu. choti</i>	1151 (51.6)	1081 (48.4)	25 (16.1)	26 (7.3)	835 (52.6)	380 (53.6)	785 (55.0)	172 (19.7)	9 (14.8)	0.91
<i>Lu. amazonensis</i>	590 (68.7)	269 (31.3)	0 (0)	0 (0)	391 (24.6)	80 (11.3)	2 (0.1)	386 (44.2)	0 (0)	0.49
<i>Lu. whitmani</i>	477 (58.5)	338 (41.5)	60 (38.7)	146 (41.2)	2 (0.1)	7 (1)	584 (40.9)	0 (0)	16 (26.2)	0.63
<i>Lu. sordellii</i>	206 (37.3)	346 (62.7)	1 (0.6)	5 (1.4)	190 (12)	135 (19)	11 (0.8)	204 (23.4)	6 (9.8)	0.80
<i>Lu. quinquefer</i>	132 (44)	168 (56)	65 (41.9)	146 (41.2)	17 (1.1)	14 (2)	31 (2.2)	17 (1.9)	10 (16.4)	0.80
<i>Lu. longispina</i>	71 (48)	77 (52)	1 (0.6)	6 (1.7)	73 (4.6)	24 (3.4)	1 (0.1)	42 (4.8)	1 (1.6)	0.68
<i>Lu. evandroi</i>	32 (43.2)	42 (56.8)	3 (1.9)	12 (3.4)	15 (0.9)	16 (2.3)	6 (0.4)	6 (0.7)	16 (26.2)	0.72
<i>Lu. complexa</i>	42 (66.7)	21 (33.3)	0 (0)	0 (0)	27 (1.7)	7 (1)	1 (0.1)	28 (3.2)	0 (0)	0.33
<i>Lu. naftalekatzi</i>	19 (40.4)	28 (59.6)	0 (0)	3 (0.8)	14 (0.9)	26 (3.7)	0 (0)	4 (0.5)	0 (0)	0.38
<i>Lu. brasiliensis</i>	22 (73.3)	8 (26.7)	0 (0)	8 (2.3)	6 (0.4)	8 (1.1)	6 (0.4)	2 (0.2)	0 (0)	0.33
<i>Lu. barrettoii barrettoii</i>	1 (4.5)	21 (95.5)	0 (0)	0 (0)	11 (0.7)	8 (1.1)	0 (0)	2 (0.2)	1 (1.6)	0.27
<i>Lu. capixaba</i>	1 (9.1)	10 (90.9)	0 (0)	2 (0.6)	0 (0)	1 (0.1)	0 (0)	8 (0.9)	0 (0)	0.18
<i>Lu. shannoni sensu lato</i>	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (0.1)	1 (0.1)	0 (0)	2 (0.2)	0 (0)	0.10
<i>Lu. wellcomei</i>	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.03
<i>Lu. furcata</i>	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)	0.10

<i>Lu. aragaoi</i>	0 (0)	2(100)	0 (0)	0 (0)	2 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.03
<i>Lu. ayrozai</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.02
<i>Lu. walkeri</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)	0.08
<i>Lu. sallesi</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.01
Total	2748 (53.2)	2419 (46.8)	155 (3)	354 (6.9)	1588 (30.7)	709 (13.7)	1427 (27.6)	873 (16.9)	61 (1.2)	n/a

n/a: not applicable.

**Table 3**

Diversity indices based on data obtained from monthly collections, 2013–2014, Pernambuco, north-eastern Brazil.

Indices	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6	Site 7
Species richness	6	9	15	15	9	12	9
Individuals ( <i>n</i> )	155	354	1588	709	1427	873	61
Shannon ( <i>H'</i> )	1.168	1.322	1.376	1.525	0.8805	1.497	1.779
Equitability ( <i>J'</i> )	0.6516	0.6015	0.5081	0.563	0.4007	0.6026	0.8094

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo indica que *Lu. whitmani* é encontrada principalmente no ambiente peridomiciliar, mesmo em áreas rurais de baixa densidade residencial com exploração mista de floresta e agricultura, no Nordeste do Brasil.

Os dados apontam que nos locais de coleta, espécies de flebotomíneos adaptados a áreas de mata podem ser encontradas em locais de peridomicílio.

A variação sazonal mostra que os flebotomíneos estavam presentes em todos os meses de estudo, sendo mais numerosos em novembro e dezembro. *Lu. choti* foi a espécie mais frequente, seguido de *Lu. sordellii*, *Lu. quinquefer*, *Lu. evandroi*, *Lu. longispina*, *Lu. whitmani* e *Lu. amazonensis*.

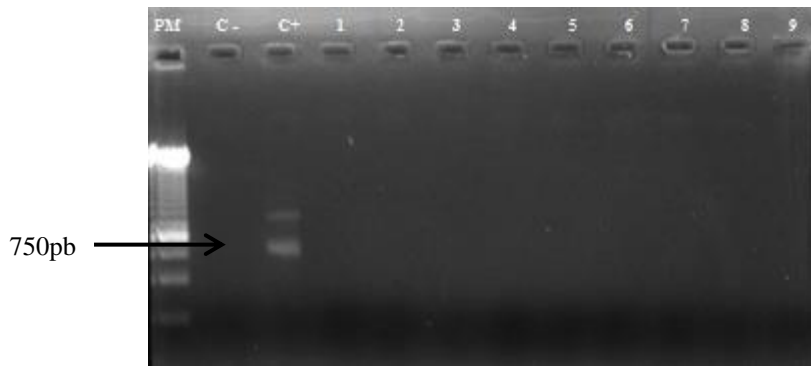
Por fim, salienta que o número diário de flebotomíneos (incluindo *Lu. whitmani*) capturados é significativamente correlacionado com variáveis climáticas, incluindo déficit de saturação que pode representar um parâmetro útil para o estudo das populações de flebotomíneos em áreas onde a leishmaniose é endêmica.

## 7. APÊNDICES



**Figura 1-** Distribuição dos ecótipos onde foram instaladas armadilhas tipo CDC, em Ipojuca, PE. **Fonte:** Miranda (2014).

**Legenda:** P1 – Intradomicílio; P2 – Peridomicílio (galinheiro casa 01); P3 – Mata 01; P4 – Mata 02; P5 – Estábulo (casa 02); P6 – Mata 03; P7 – Peridomicílio (galinheiro casa 03).



**Figura 2.** Reações em cadeia da polimerase para o gênero *Leishmania* realizado em fêmeas de flebotomíneos. PM (Peso molecular); C- (controle negativo); C + (controle positivo); 1-9 (fêmea *Lu. whitmani*).