

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Kamila Gaudêncio da Silva Sales

**PCR EM TEMPO REAL PARA CARACTERIZAÇÃO DE FONTES ALIMENTARES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

RECIFE

2015

KAMILA GAUDÊNCIO DA SILVA SALES

**PCR EM TEMPO REAL PARA CARACTERIZAÇÃO DE FONTES ALIMENTARES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Filipe Dantas-Torres

Recife

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S163p Sales, Kamila Gaudêncio da Silva.
PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) / Kamila Gaudêncio da Silva Sales. - Recife: [s.n.], 2015.
66 p. : il., graf, tab, ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: Filipe Dantas Torres.

1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 2. Psychodidae - fisiologia. 3. Leishmaniose - transmissão. 4. Reservatórios de Doenças. 5. Comportamento alimentar - fisiologia. 6. Insetos Vetores - fisiologia. 7. Citocromos b - análise . 8. Sangue - parasitologia. 9. Sensibilidade e Especificidade. 1. Torres, Filipe Dantas. ths. II. Título.

KAMILA GAUDÊNCIO DA SILVA SALES

**PCR EM TEMPO REAL PARA CARACTERIZAÇÃO DE FONTES ALIMENTARES
DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Filipe Dantas-Torres

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Sival Pinto Brandão-Filho

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

*À Joselita,
Karoline, Giselle, e Thiago,
que são a minha força.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus. Meu mestre, meu refúgio.

À minha família por todo amor, força e incentivo.

A Dr. Filipe Dantas-Torres, pela oportunidade de poder aprender. Agradeço por confiar em mim, por ter me dedicado seu valioso tempo, apoio incondicional na realização deste estudo. Como sempre digo: você é *Fera*, DANTES!

À Dra. Milena de Paiva Cavalcanti, pelo apoio para realização deste trabalho e ensinamentos a mim concebidos.

A todos que contribuíram de alguma forma nessa longa jornada, em especial: Sinval P. Brandão Filho, Luciana A. Figueredo, Maria E. F. de Brito, Domenico Otranto, Maria Stefania Latrofa, Pietra L. Costa, Fernando J. da Silva e Assis B. Nunes.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia – LIMP: Lays Trajano, Luana Patrícia, Rômulo Pessoa, Mineo Nakasawa, Ana Karine, Juliana Viana, Andréa Sales, Patrícia Areias e Amanda pelo convívio e apoio durante as atividades no laboratório.

A todos os amigos, por todo companheirismo, especialmente Rayana Morais, Débora Miranda, Edivania Nascimento, Edilma Silva, Suênia Gonçalves, Edileuza Santos e Kyldman Thais.

À turma de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde 2013.2, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro.

SALES, Kamila Gaudêncio da Silva. **PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae)**. 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

Os flebotomíneos são insetos hematófagos de grande importância médica e veterinária atuando como vetores de parasitas como *Leishmania*. O estudo do padrão alimentar desses vetores pode ajudar a compreender a sua interação com potenciais reservatórios de *Leishmania*. Neste estudo, desenvolvemos ensaios de PCR em tempo real para identificação de sangue em flebotomíneos. Seis pares de *primers* foram desenhados com base no gene citocromo b de sequências disponíveis no GenBank dos seguintes hospedeiros potenciais: cão, gato, cavalo, galinha, rato e humano. Primeiramente, os ensaios de PCR em tempo real utilizando SYBR Green foram conduzidos usando uma curva padrão com oito concentrações diferentes (*i.e.*, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg por 2 µl) de amostras do DNA extraído do sangue com EDTA a partir de cada espécie de animal. Em seguida, o DNA foi extraído de 100 fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas de campo pertencentes a três espécies (*i.e.*, *Lutzomyia longipalpis*, *L. migonei* e *L. lenti*) foram testadas pelos protocolos aqui padronizados. Fêmeas de flebotomíneos foram experimentalmente alimentadas em um rato (*Rattus rattus*) e utilizadas para avaliar a detecção do ensaio. Os protocolos funcionaram de forma eficiente com limites de detecção de 10 pg a 100 fg. Fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas coletadas no campo estavam alimentadas de humanos (73%), galinhas (23%), cães (22%), cavalos (15%), ratos (11%) e gatos (2%). Curiosamente, 76,1% das fêmeas de *L. longipalpis* foram positivas para o sangue humano. No total, 48% das fêmeas testadas estavam alimentadas em uma única fonte, 31% em duas e 12% em três. A análise do curso de tempo mostrou que a técnica de PCR em tempo real visando o DNA de roedor foi capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do hospedeiro até 5 dias após o repasto sanguíneo. Esses protocolos representam ferramentas promissoras para a identificação da fonte alimentar de flebotomíneos de campo.

Palavras-chave: Epidemiologia, Psychodidae, PCR em tempo real.

SALES, Kamila Gaudêncio da Silva. **Real-time PCR for the characterization of feeding sources of sand flies (Diptera: Psychodidae)**. 2015. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies are blood-feeding insects of great medical and veterinary significance, acting as vectors of *Leishmania* parasites and other pathogens. Studying the blood-feeding pattern of these vectors may help understanding their interactions with potential reservoirs of *Leishmania*. In this study, we developed real time PCR assays for sand fly blood meal identification. Six pairs of primers were designed based on *cytochrome b* gene sequences available in GenBank of the following potential hosts: dog, cat, horse, chicken, rat, and human. Firstly, SYBR Green-based real time PCR assays were run using a standard curve with eight different concentrations (i.e., 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg and 1 fg per 2 µl) of DNA extracted from EDTA blood samples from each animal species. Then, DNA was extracted from 100 field-collected engorged female sand flies belonging to three species (i.e., *Lutzomyia longipalpis*, *L. migonei* and *L. lenti*) were tested by the protocols standardized herein. Female sand flies were experimentally fed on a rat (*Rattus rattus*) and used for evaluating the time course of the detection of the assay. The protocols worked efficiently with detection limits from 10 pg to 100 fg. Field collected female sand flies contained blood from humans (73%), chickens (23%), dogs (22%), horses (15%), rats (11%) and cats (2%). Interestingly, 76.1% of the *L. longipalpis* females were positive for human blood. In total, 48% of the tested females were fed on single sources, 31% on two and 12% on three. The analysis of the time course showed that the real time PCR assay targeting the rodent DNA was able to detect small amounts of the host DNA up to 5 days after the blood meal. These assays represent promising tools for the identification of blood meal in field-collected female sand flies.

Key-words: Epidemiology, Psychodidae, real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fêmea de flebotomíneo	15
Figura 2 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. Dependendo da espécie do protozoário envolvido, a doença evolui para a forma visceral ou cutânea. Nota: VL - Leishmaniose visceral; CL - Leishmaniose tegumentar.....	23
Figura 3 -	Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para CLF (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, EC, FC, RR e HS).....	37
Figura 4 -	Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para EC (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, CLF, FC, RR e HS).....	37
Figura 5 -	Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para RR (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, CLF, FC, EC e HS).....	37
Figura 6 -	Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para GG (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (CLF, EC, FC, RR e HS).....	38
Figura 7 -	Detecção de DNA de roedor (padrão: 1 pg DNA de rato; NTC: controle negativo) por PCR em tempo real em diferentes intervalos de tempo (1-142 h).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos <i>primers</i> desenhados para desenvolvimento dos sistemas baseados em PCR em tempo real	33
Tabela 2 - Coeficiente de determinação (r^2), eficiência (ϵ) e <i>slope</i> das curvas padrão por tipo de sangue	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (nucleotídeos)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CL	Leishmaniose cutânea
Cm	Centímetro
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Ct	<i>Cycle threshold</i>
°C	Graus Celsius
Cyt b	<i>Cytochrome b</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fg	Fentograma
g	Gramma
kg	Quilograma
LPG	Lipofosfoglicana
Log	Logaritmo
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MP	Matriz peritrófica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTC	<i>No template control</i>
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

qPCR	Quantitativa PCR
pg	Picograma
pmol	Picomol
T _m	<i>Melting temperature</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
μl	Microlitro
ΔC _t	Diferença dos valores de C _t s
ε	Eficiência da reação de qPCR
σ	Especificidade da reação de qPCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Flebotomíneos	13
1.1.1 Taxonomia.....	13
1.1.2 Biologia e ecologia.....	14
1.2 Importância médica	17
1.2.1 Leishmanioses.....	18
1.2.2 Arboviroses.....	19
1.2.3 Bartonelose.....	21
1.3 Competência vetorial	21
1.4 Relação parasito-vetor	23
1.5 Fonte alimentar de flebotomíneos	24
2 JUSTIFICATIVA	27
3 PERGUNTA CONDUTORA	28
4 HIPÓTESE	29
5 OBJETIVOS	30
5.1 Geral.....	30
5.2 Específicos.....	30
6 METODOLOGIA	31
6.1 Captura e triagem dos flebotomíneos.....	31
6.2 Amostragem e aspectos éticos.....	31
6.3 Coleta de sangue.....	32
6.4 Extração de DNA.....	32
6.5 Desenho dos <i>primers</i>	32
6.6 PCR em tempo real.....	34
6.6.1 Sensibilidade analítica, eficiência e especificidade.....	34
6.7 Sequenciamento.....	35
6.8 Análise dos dados.....	35
7 RESULTADOS	36
7.1 Sensibilidade analítica, eficiência e especificidade.....	36
7.2 Detecção das fontes alimentares em flebotomíneos.....	38
8 DISCUSSÃO	40

9 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A - TCLE.....	55
APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO.....	56
ANEXO A.- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO.....	62
ANEXO B – CEP.....	63
ANEXO C - SISBIO.....	64

1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos hematófagos de distribuição cosmopolita e grande importância médica e veterinária. Possuem vários nomes vulgares, como “mosquito-palha” (devido à sua coloração amarelada semelhante à palha vegetal), “asa-branca” e “asa-dura” (por possuírem asas grandes de formato lanceolado que se mantêm eretas durante o pouso), “tatuquira” (devido ao hábito de se abrigarem em buracos de tatu), “arrepido” (por possuírem o corpo piloso), “pula-pula” (devido ao voo do tipo saltitante) e, erroneamente, de “mosquitos” (MARTINS; WILLIAMIS; FALCÃO, 1978). No entanto, algumas dessas denominações são incorretas, particularmente, os flebotomíneos não devem ser chamados de mosquitos, pois eles apresentam características morfológicas e biológicas que os distinguem dos insetos da família Culicidae.

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).

As dificuldades enfrentadas pelos programas de controle de doenças transmitidas por vetores como dengue e leishmaniose no Brasil, estão relacionadas principalmente com o controle de vetores e ao tratamento, sendo esse último muitas vezes de longa duração ou inexistente (p.ex., não existe tratamento específico no caso da febre do dengue) (BARRETO et al., 2011). De forma geral, as leishmanioses se apresentam como doenças focais. Ou seja, a maior parte dos casos está concentrada em uma área específica, onde flebotomíneos vetores, hospedeiros reservatórios e população susceptível se encontram e interagem (DANTAS-TORRES et al., 2010).

1.1 Flebotomíneos

1.1.1 Taxonomia

Pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae. Essa família, por sua vez, está dividida em seis subfamílias (Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Horaiellinae, Psychodinae, Sycoracinae e Phlebotominae), sendo os flebotomíneos membros da subfamília Phlebotominae (FORATTINI, 1973).

Os primeiros registros da subfamília Phlebotominae datam do Cretáceo Inferior (LEWIS, 1982). A primeira espécie de flebotomíneo foi descrita por Scopoli em 1786 na Itália, que após anos sendo chamada de *Bibio papatasi* teve a sua nomenclatura alterada e hoje é conhecida como *Phlebotomus papatasi* (DEDET; VIGNES; RANGEL, 2003). Os primeiros flebotomíneos americanos foram descritos por Coquillett (1907) e Lutz e Neiva (1912) foram os primeiros pesquisadores a descrever a presença dos flebotomíneos no Brasil.

A subfamília Phlebotominae é composta por seis gêneros; *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994). Uma chave de identificação foi proposta por Galati (1995, 2003), que utilizou o método cladístico para estudar os flebotomíneos americanos reclassificando os flebotomíneos do Novo Mundo em 22 gêneros. No entanto, a classificação tradicional ainda tem sido utilizada pela maioria dos autores.

Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia* é mais diverso e de mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai. De acordo com a classificação tradicional, o gênero *Lutzomyia* é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG; DUNCAN, 1994). Atualmente, são conhecidas aproximadamente 988 espécies de flebotomíneos, com 512 espécies viventes e 17 fósseis nas Américas (BATES et al., 2015).

1.1.2 Biologia e ecologia

Esses insetos são de pequeno porte medindo geralmente de 0,3 a 0,4 cm de comprimento (KILLICK-KENDRICK, 1999), são holometábolos, apresentando estágios de ovo, larva (quatro estádios ou ínstars), pupa e adulto. Apresentando intensa pilosidade, pernas longas e delgadas, voo do tipo saltitante, coloração amarelada, asas grandes de formato lanceolado que se mantêm eretas e afastadas do corpo quando em repouso (Figura 1) (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Figura 1- Fêmea de flebotomíneo.



Fonte: Collins (2011).

Os ovos de flebotomíneos são de forma elipsoide ou ovoide e medem de acordo com a espécie, de 300 a 500 μm de comprimento por 70 a 150 μm de largura e a postura é feita isoladamente ou em pequenos grupos, permanecendo aderidos ao substrato, devido a uma substância produzida pelas glândulas acessórias (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Esta substância é composta principalmente de ácidos graxos e recobre todo o ovo, favorecendo a permeabilização e podendo também atuar como feromônio de oviposição (BRAZIL; BRAZIL, 2003; MAROLI et al., 2013; RANGEL; LAINSON, 2003; REY, 1992). Entre sete e 17 dias após a postura acontece a eclosão dos ovos, que ocorrerá de acordo com as condições disponíveis do ambiente (substrato úmido e sombreado e rico em matéria orgânica) e da quantidade de sangue ingerido pela fêmea. As formas imaturas podem ser encontradas em diferentes ambientes domésticos (*e.g.*, porões de casas, construções abandonadas, fendas de chão e paredes), peridomésticos (*e.g.*, tocas de animais, aterros, latrinas e sob pedras) e silvestres (*e.g.*, cavernas, toca de roedores, formigueiros e raízes tubulares) (FELICIANGELI, 2004; FORATTINI, 1973; MORALES; BELLO; CARDENAS, 2005; SANGIORGI et al., 2012).

As larvas são pequenas, brancas e de aspecto vermiforme. A fase larval passa por quatro estádios por meio de três mudas e são constituídas por 12 segmentos, sendo três torácicos e nove abdominais (iguais, com exceção dos dois últimos que são modificados à

função locomotora). Apresentam apêndices cefálicos (antenas), que variam de acordo com o estágio larvar e a espécie, e as peças bucais são do tipo triturador. Alimentam-se de matéria orgânica, 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 microhabitats com abundância em matéria orgânica, com duração de três semanas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

As pupas possuem coloração branco-amarelada, permanecendo aderidas ao substrato até emergirem, adquirindo uma tonalidade mais escura. 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 (BRAZIL; BRAZIL, 2003; FERRO et al., 1997).

Quando adultos, os flebotomíneos apresentam dimorfismo sexual evidente. O comportamento alimentar que expressa hematofagia é exclusivo da fêmea. O macho possui a probóscide mais curta, já nas fêmeas é mais longa e adaptada para picar e sugar; os últimos segmentos abdominais são modificados para constituir a genitália do inseto onde no macho está presente um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (importante para taxonomia), enquanto às fêmeas os segmentos são menores e apresentam estruturas internas (espermoteca), conferindo um aspecto arredondado (ALEXANDER, 2000; BRAZIL; BRAZIL, 2003; FERRO et al., 1997).

Os flebotomíneos adultos possuem o aparelho bucal do tipo picador-sugador o que permite efetuar alimentação de carboidratos como: glicose, frutose, sacarose, turamose, melezitose, rafinose, maltose e trealose, obtidos de seiva de plantas, néctar e secreções de afídeos (ALEXANDER; USMA, 1994). Os flebotomíneos após ingerirem uma substância açucarada, esta é armazenada no divertículo, de onde é levada para o trato digestivo e em seguida é absorvida. Esses carboidratos são utilizados principalmente como fonte de energia para exercerem as suas principais atividades de voo, acasalamento, postura, garantindo a sobrevivência. Esses açúcares também possuem importante papel no desenvolvimento e infectividade de *Leishmania*, pois atuam controlando a flora bacteriana intestinal do inseto, atuando como bacteriostáticos e como fonte de energia para os parasitas que demonstram multiplicar-se mais facilmente no trato digestivo dos flebotomíneos (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Apenas as fêmeas adultas no período reprodutivo são hematófagas, sendo o sangue alimento fundamental para a maturação dos ovos, utilizado como fonte de proteínas e aminoácidos (FORATTINI, 1973). Normalmente realizam um único repasto a cada ciclo de

reprodução (ovogênese), mas em algumas espécies foram observados mais de um repasto antes da oviposição, tal comportamento ocorreria pelas variações climáticas, altas temperaturas e baixa umidade, prejudicando a oviposição, sendo necessário mais de um repasto para reposição hídrica (BRAZIL; BRAZIL, 2003). O número de ovos produzidos está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido (READY, 1979), de maneira que a quantidade de sangue varia de acordo com a espécie, onde o inseto pode ingerir o volume de sangue igual ao próprio peso, que pode variar de 0,1 a 0,6 mg (RANGEL; LAINSON, 2003).

Os flebotomíneos possuem hábitos crepusculares ou noturnos para realizarem a hematofagia. Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo introduz a peça bucal na pele do hospedeiro, lacerando o tecido e formando uma pequena poça de sangue. Durante a hematofagia o inseto libera saliva que apresenta diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, imunossupressores e vasodilatadores (KAMHAWI, 2006; RIBEIRO; SCHNEIDER; GUIMARÃES, 1995). Após a ingestão o sangue é direcionado ao intestino médio e em seguida o bolo alimentar formado sofre a ação de enzimas secretadas pelo intestino médio (*e.g.* tripsinas, amino-carboxipeptidases). Assim, a digestão permite a conversão de nutrientes sanguíneos em proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos (PIMENTA et al., 2003).

A preferência dos flebotomíneos ao hospedeiro vertebrado para a obtenção do sangue é bastante variada. O comportamento pouco seletivo de algumas espécies leva esses insetos hematófagos a se alimentarem em diversas fontes de vertebrados, inclusive humanos. Esse comportamento facilita a transmissão de doenças (KILLICK-KENDRICK, 1999). A diversidade vegetal, animal e fatores microclimáticos que caracterizam as florestas tropicais fornecem recursos alimentícios, abrigos e condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos flebotomíneos, influenciando a abundância e diversidade de espécies (SILVA et al., 2007).

Certas espécies dependem muito das características específicas do tipo de floresta, o que determina sua especificidade a um único tipo de floresta, outras espécies, por sua vez, podem estar relacionadas a mais de um tipo de vegetação (FEITOSA; CASTELLON, 2006; SILVA et al., 2007).

1.2 Importância médica

A importância dos flebotomíneos para o homem e para os animais se deve principalmente o seu papel como vetores de vírus, bactérias e protozoários, e também por

afetarem diretamente as pessoas, com suas picadas dolorosas que podem, inclusive, causar reações alérgicas (MAROLI et al., 2013, SHERLOCK, 2003).

1.2.1 Leishmanioses

De um modo geral, entre as doenças transmitidas por flebotomíneos, as leishmanioses assumem um papel preponderante. As leishmanioses são, em sua maioria, zoonoses causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que acometem o homem e algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, os quais podem atuar como hospedeiros reservatórios dos parasitos. São reconhecidas cerca de 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (BARRAL; COSTA, 2011).

Existem quatro principais tipos de leishmanioses: leishmaniose tegumentar, leishmaniose tegumentar difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). De acordo com a espécie de *Leishmania* e com a resposta imune do hospedeiro a doença pode assumir diferentes formas clínicas. Nas Américas, circulam 11 espécies dermatóricas de *Leishmania* causadoras da doença (BRASIL, 2006). No Brasil, já foram verificadas diversas espécies que causam leishmaniose tegumentar no homem, a saber: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L.(V.) lindenbergi* (LAINSON; SHAW, 1998). Já em relação à leishmaniose visceral (LV), *L.(L.) infantum* (= *L. chagasi*) é a espécie responsável pela grande maioria dos casos humanos e animais.

Atualmente as leishmanioses ocorrem em 98 países (distribuídos em cinco continentes), mas a sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (ALVAR et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano, das diferentes formas clínicas (ALVAR et al., 2012; WHO, 2010).

A fauna de flebotomíneos no Brasil é uma das faunas mais bem estudadas em todo o mundo (GALATI, 2003). Isto se torna importante para obtenção de informações base para desenvolvimento de políticas públicas de saúde voltadas para o programa de controle das leishmanioses no país. No Brasil várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas na transmissão da leishmânias causadoras de leishmaniose tegumentar, incluindo *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia umbratilis* e *Lutzomyia anduzei* (RANGEL;

LAINSON, 2009). Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetores por atenderem aos critérios que definem a competência vetorial de uma determinada espécie (MAROLI et al., 2013). No caso da LV, a principal espécie associada à transmissão é *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005). No entanto, em algumas áreas *L. migonei*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* têm sido indicadas como potenciais vetores (CARVALHO et al., 2010; PITA-PEREIRA et al., 2008; SALOMÓN et al., 2010; SANTOS et al., 1998; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Diversos estudos sobre flebotomíneos vêm sendo desenvolvidos no Estado de Pernambuco, fornecendo novos conhecimentos na ecoepidemiologia das leishmanioses no nordeste do Brasil. Pelo menos 37 espécies de flebotomíneos foram relatadas previamente nesse Estado (DANTAS-TORRES et al., 2010). 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 de Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (DANTAS-TORRES et al., 2010).

Pernambuco é representado pela Mata Atlântica e pela Caatinga que são biomas que abrigam um vasto número de espécies de flebotomíneos (DANTAS-TORRES et al., 2010). Em algumas regiões da Zona da Mata Sul de Pernambuco, *L. whitmani* é a espécie mais abundante (BRANDÃO-FILHO et al., 1999), ao passo que *L. complexa* é a principal representante da fauna da Zona da Mata Norte (ANDRADE, 2005). Ambas as espécies são apontadas como vetores de *L. (V.) braziliensis* no Brasil (MAROLI et al., 2013).

1.2.2 Arboviroses

De acordo com Shaw et al. (2003), a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda alguns critérios para o reconhecimento de um artrópode como vetor de um arbovírus. É preciso isolar o vírus de artrópodes coletados no campo, comprovar a capacidade do artrópode se infectar por meio a alimentação sobre um hospedeiro vertebrado infectado pelo vírus ou através de uma suspensão artificial do vírus, comprovar a capacidade do inseto em transmitir o vírus biologicamente através da picada, além de obter evidências no campo, confirmando a associação do artrópode com o vertebrado, no qual a doença ou infecção esteja ocorrendo. De acordo com os critérios acima, os vetores são distribuídos nas seguintes categorias: vetores suspeitos (aqueles que atendem a um dos critérios estabelecidos pela OMS), vetores potenciais (satisfazem aos testes de infecção natural e transmissão experimental) e vetores confirmados (preenchem todos os critérios propostos pela OMS).

Os flebotomíneos estão envolvidos na transmissão de alguns vírus, dentre os quais os mais importantes são agrupadas no gênero *Phlebovirus* (família Bunyaviridae) e ao gênero *Vesiculovirus* (família Rhabdoviridae) (MAROLI et al., 2013). Aproximadamente 39 sorotipos de *Phlebovirus* são reconhecidos, sendo que 25 destes estão presentes no Novo Mundo (SHAW et al., 2003). No velho mundo a infecção por *Phlebovirus* tem sido na associada à presença flebotomíneos nas seguintes áreas: sul da Europa, África, Oriente Médio e Ásia Central e Ocidental (TESH et al., 1976).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus atualmente alguns *Phlebovirus* estão associados à flebotomíneos no Velho Mundo, estes incluem: vírus da febre dos flebotomíneos de Nápoles, que inclui o vírus Nápoles, vírus Teerã, vírus Karimabad e vírus da Toscana; o vírus Salehabad, inclui os vírus Salehabad e vírus Arbia. O vírus siciliano e o vírus Corfou também foram isolados e adicionados ao gênero *Phlebovirus* (ANAGNOSTOU et al., 2011; COLLAO et al., 2010; MOUREAU et al., 2010).

Alguns novos *Phlebovirus* foram detectados através de testes moleculares, como por exemplo, a presença de um *Phlebovirus* intimamente relacionado, contudo distinto do vírus siciliano foi relatado na Argélia (MOUREAU et al., 2010), Tunísia (ZHIOUA et al., 2010) e Turquia (CARHAN et al., 2010; KOCAK TUFAN et al., 2011). O vírus Adria (semelhante ao vírus Arbia) foi detectado, porém não isolado, em flebotomíneos coletados na Albânia (ANAGNOSTOU et al., 2011; PAPA; VELO; BINO, 2010). Nas Américas, os flebotomíneos identificados como vetores de *Phlebovirus* são: *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia ylephiletor*, *L. flaviscutellata*, *L. umbratilis*, *Lutzomyia panamensis* e *Lutzomyia sanguinaria* (ADLER; THEODOR, 1926). No Velho Mundo, as espécies vetoradas conhecidas são: *P. papatasi*, *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus perfiliewi* (MAROLI et al., 2013).

De acordo com Wunner et al. (1995) cerca de 28 agentes virais do gênero *Vesiculovirus* infectam vertebrados e invertebrados. Três vesiculoviroses são conhecidas: vírus da estomatite vesicular (VSV)-Alagoas, VSV-Indiana e VSV-New Jersey (MAROLI et al., 2013). O vírus estomatite vesicular causa estomatite em humanos e animais domésticos (gado, cavalos e porcos) estão presentes no Novo Mundo. No Brasil na região amazônica dois vírus do gênero *Vesiculovirus* (vesiculovírus Carajás e Marabá) foram isolados em fêmeas de *Lutzomyia* spp. capturadas em Serra Norte, município de Marabá, estado do Pará (COMER; TESH, 1991). As espécies *L. trapidoi*, *L. ylephiletor* e *Lutzomyia shannoni* têm sido associadas com a transmissão de VSV (COMER; TESH, 1991).

O vírus Chandipura da encefalite e o vírus Isfahan são endêmicos no Velho Mundo, em algumas partes da Índia, Irã, e Turcomenistão e outras repúblicas da Ásia Central

(BASAK et al., 2007; GAIDAMOVICH et al., 1978; TESH et al., 1977). Chandipura vírus foi isolado de pools de *Phlebotomus* spp. (DHANDA et al., 1972) e também foi detectado em flebotomíneos pertencentes ao gênero *Sergentomyia* (GEEVARGHESE et al., 2005). Contudo, em áreas que o vírus está presente a espécie suspeita e predominante é *P. papatasi* (MAROLI et al., 2013). Vale ressaltar, que o diagnóstico de infecção por esses agentes é difícil e escassa atenção é dada para tais casos, porque os mesmos são facilmente confundidos com malária, influenza e outras doenças virais respiratórias ou outras arboviroses (SHAW et al., 2003).

1.2.3 Bartonelose

O agente etiológico da bartonelose é a bactéria *Bartonella bacilliformis*, estas são bacilos Gram negativos, aeróbios e móveis que infectam células do sistema retículo endotelial (MAROLI et al., 2013). Nos seres humanos, a bartonelose provoca uma enfermidade conhecida como doença de Carrión, que apresenta duas fases clínicas distintas: uma fase aguda, conhecido como “febre de Oroya” (compreendendo severa anemia hemolítica, dores articulares e febre e icterícia), e uma fase eruptiva chamada de “verruca peruana” (usualmente se desenvolve após o paciente recuperar-se da febre de Oroya e pode persistir cerca de um ano no indivíduo contaminado, desaparecendo em seguida (MAROLI et al., 2013; TICONA et al., 2010). Este patógeno é transmitido pela picada flebotomíneos da 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 esporadicamente relatada na Bolívia e no Chile (SANCHEZ CLEMENTE et al., 2012). Ademais, alguns estudos mostram que no Peru outras espécies de flebotomíneos podem também estar envolvidas na transmissão da doença, assim como *Lutzomyia noguchii* e *L. peruensis* (YOUNG; DUNCAN, 1994).

1.2 Competência vetorial

Estudos sobre a interação dos flebotomíneos com diferentes espécies de *Leishmania* têm contribuído para o entendimento da competência vetorial desses artrópodes. Diante disso, Killick-Kendrick (1990) propôs cinco critérios para que se possa incriminar uma determinada espécie de flebotomíneo como vetor de *Leishmania* sp.: 1) promastigotas deverão ser isoladas de fêmeas de campo não ingurgitadas recentemente (com menos de 36 h após o repasto); 2)

formas infectantes de *Leishmania* spp. deverão ser vistas na parte anterior do intestino e da válvula estomodeal de fêmeas naturalmente infectadas ou provenientes de colônia após xenodiagnóstico; 3) o vetor deve picar o hospedeiro; 4) associação ecológica, entre o vetor e os seres humanos e em qualquer outro hospedeiro reservatório; e 5) transmissão experimental eficaz após infecção de uma espécie de hospedeiro natural ou modelo equivalente de laboratório.

Recentemente dois novos critérios foram acrescentados para aprimorar aos que já foram sugeridos: 1) utilização de dados retrospectivos e modelagem matemática demonstram que o vetor pode ser essencial para manter a transmissão com ou sem o envolvimento de outros vetores; e 2) uma modelagem matemática com base em um programa de controle planejado demonstra que a incidência da doença diminui significativamente com uma diminuição significativa na densidade do vetor (READY, 2013).

Diante disso, os vetores podem ser divididos em vetores específicos (são aqueles que permitem o crescimento de apenas uma espécie de *Leishmania*) e vetores permissivos (suportam o desenvolvimento de mais de uma espécie) (WHO, 2010). Algumas barreiras naturais existentes dentro do flebotomíneo vão conduzir à refração ou susceptibilidade do inseto à infecção (READY, 2013).

De acordo com Pimenta et al. (2003) os principais fatores que influenciam na competência de uma dada espécie de flebotomíneo em atuar como um vetor estão relacionados com a capacidade das leishmânias de resistirem às ações das enzimas digestivas presentes no intestino médio do inseto, de aderirem ao epitélio intestinal no momento da excreção do resto alimentar, de escaparem da matriz peritrófica (MP) que envolve o bolo alimentar; completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, atingindo o desenvolvimento e distinção de formas infectantes.

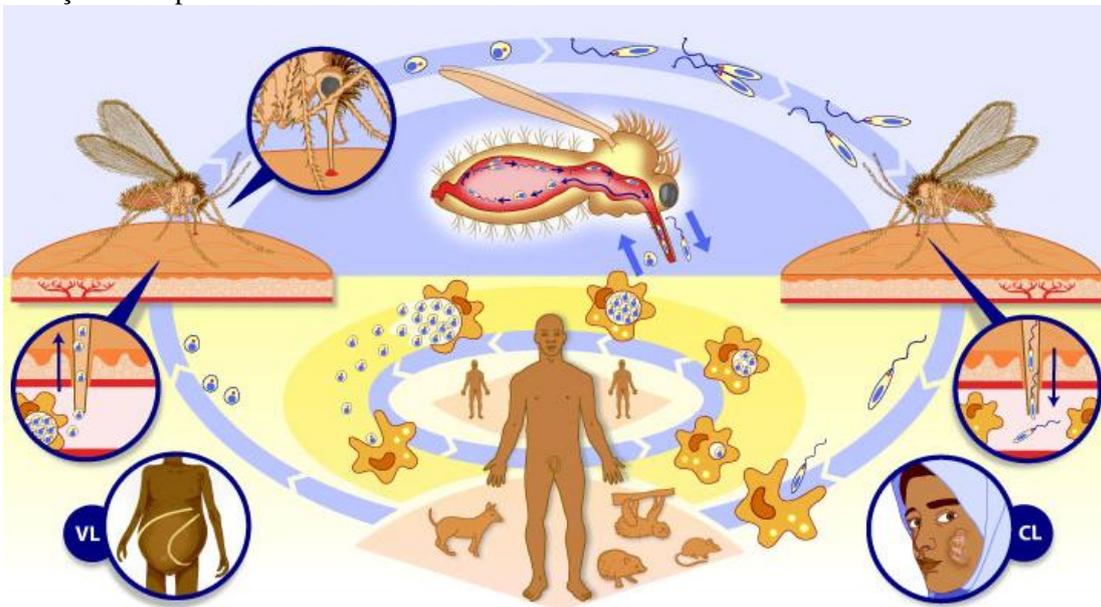
Por outro lado, é importante destacar que o papel de determinadas espécies de flebotomíneos como vetor não depende apenas da sua habilidade de permitir a metaciclogênese do parasito, mas também da sua capacidade de transmitir as formas infectantes (KILLICK-KENDRICK, 1990). Alguns flebotomíneos realizam mais de um repasto sanguíneo por ciclo reprodutivo, apresentando capacidade oportunista para se alimentar de vários vertebrados; A realimentação em determinados animais domésticos pode aumentar a sua habilidade em transmitir *Leishmania* spp. em áreas em que a doença é endêmica (aumentando a capacidade vetorial) (SECUNDINO et al., 2011).

1.4 Relação parasito-vetor

Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado a fêmea ao ingerir o parasito na forma amastigota. Essa forma é rapidamente transportada ao intestino médio do inseto e envolta pela MP junto ao bolo sanguíneo (PIMENTA et al., 1997; SECUNDINO et al., 2005; WALTERS et al., 1993, 1995). Após um período de 12 a 20h as amastigotas se diferenciam em promastigotas. Após várias mudanças e intensa multiplicação, as promastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, forma infectante do parasito (DESCOTEAUX; TURCO 1999; SACKS; PERKINS, 1984).

Ao final de seu processo evolutivo no vetor, os parasitos atingem o intestino anterior do inseto e eventualmente são transmitidas a um hospedeiro vertebrado durante um repasto sanguíneo sucessivo (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2005). As promastigotas são introduzidas no hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor e invadem o sistema fagocítico mononuclear iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito, recomeçando o ciclo (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Dependendo da espécie do protozoário envolvido, a doença evolui para a forma visceral ou cutânea.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010).

Nota: VL - Leishmaniose visceral; CL - Leishmaniose tegumentar.

De acordo com Secundino et al. (2011), as leishmânias devem superar algumas barreiras, incluindo a ação das enzimas digestivas, a MP e o processo de excreção. De fato, o processo digestivo do flebotomíneo representa um conjunto de fenômenos adversos ao desenvolvimento das leishmânias que, ao longo do seu processo evolutivo, desenvolveram mecanismos para superar essas barreiras. Por exemplo, a resistência das formas promastigotas

às enzimas digestivas dentro do intestino do vetor se deve a presença de moléculas em sua superfície (lipofosfoglicano - LPG), que formam uma cobertura na superfície do parasito, impedindo a lise da membrana. Contudo, o grande desafio é a transição de amastigota para promastigota, visto que a camada celular de LPG ainda não está presente na primeira (PIMENTA et al., 2003). Assim, muitos protozoários ingeridos com a alimentação sanguínea são mortos durante a digestão no intestino médio do flebotomíneo, porém um número suficiente de leishmânias resiste à ação enzimática e multiplicam-se rompendo superando as barreiras naturais existentes no vetor (SECUNDINO et al., 2011).

A MP é formada logo após a ingestão de sangue, sendo produzida pelas células epiteliais em todo intestino médio e constituída por quitina, proteoglicanos e proteínas (PIMENTA et al., 2003). A MP apresenta diversas e importantes funções, incluindo: proteção contra patógenos; compartimentalização do alimento e permeabilização de enzimas, detoxificação e sequestro do “heme” produzido pela quebra da hemoglobina (SECUNDINO et al., 2011). As leishmânias, após se transformarem em promastigotas, produzem quitinase e escapam da MP quando necessário. Posteriormente é imprescindível que os promastigotas tenham habilidade de se aderir às células do epitélio intestinal mediadas por LPG, favorecendo a manutenção da infecção (SECUNDINO et al., 2011). As últimas barreiras enfrentadas no processo de interação do parasito com o vetor é o processo de diferenciação (metacicloênese) que produz promastigotas metacíclicas, estas são adaptadas a serem inoculadas pelos flebotomíneos vetores e a sobreviverem nos vertebrados, garantindo a continuidade do seu ciclo de vida (PIMENTA et al., 2003).

1.5 Fonte alimentar de flebotomíneos

A atração que diferentes animais silvestres e domésticos exercem sobre os flebotomíneos para alimentação compõe importante fator para o conhecimento das relações hospedeiro-vetor nos diversos ambientes, especialmente em áreas onde as leishmanioses são endêmicas (FOTENELES et al., 2009). A identificação da fonte alimentar de artrópodes hematófagos tem mostrado ser de grande utilidade no estudo da ecologia de insetos vetores de doenças (DIAS et al., 2003). Os trabalhos pioneiros para identificação de sangue ingerido por artrópodes foram realizados por King e Bull (1923) e Rice e Barber (1935), trabalhos esses que foram primordiais para a adaptação e desenvolvimento de técnicas imunológicas em outros insetos.

O teste de precipitina baseado na utilização de antissoros é uma ferramenta usualmente empregada para detecção de fonte alimentar (AFONSO et al., 2005; DIAS et al., 2003; FONTELES et al., 2009; JAVADIAN et al., 1977; MORRISON et al., 1993; NERY et al., 2004; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008; TESH et al., 1971, 1972). Ensaio imunoenzimático (ELISA) requerem o uso de anticorpos específicos para o desenvolvimento do teste (AGRELA et al., 2002; BONGIORNO et al., 2003; COLMENARES et al., 1995; GOMEZ; SANCHEZ; FELICIANGELI, 1998; MARASSÁ et al., 2004; ROSSI et al., 2008; SVOBODOVÁ et al., 2003).

Embora tenham produzido importantes informações sobre a identidade dos hospedeiros vertebrados de muitos artrópodes hematófagos, as técnicas sorológicas apresentam algumas limitações, como por exemplo: possível reação cruzada; necessidade de produção de anticorpos específicos; incapacidade de incriminar reservatórios não esperados (HAOUAS et al., 2007); não detectam repastos sanguíneos mais antigos que 24 horas (TESH et al., 1971); apresentam baixa sensibilidade (SANT'ANNA et al., 2008); e podem até não distinguir espécies filogeneticamente próximas (SILVA et al., 2001).

A espectrometria de massa é uma técnica que usa a hemoglobina como base para identificação do repasto sanguíneo em flebotomíneos e consegue acompanhar a dinâmica de digestão desta proteína no inseto (SILVA, 2006). Contudo, a hemoglobina extraída do trato digestivo dos flebotomíneos pode ser analisada durante quatro dias apenas e fica estável apenas por um ano. Com objetivo de compreender o hábito alimentar dos flebotomíneos alguns trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando observações visuais, capturas com isca humana, armadilhas contendo animais (*e.g.*, suíno, cão, coelho e galinha) (MUNIZ et al., 2006). Porém, essas observações não permitem esclarecer o complexo hábito alimentar desses dípteros em condições naturais.

Atualmente a identificação do hábito alimentar por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido realizada, utilizando o gene *prepronociceptin* (HAOUAS et al., 2007) e regiões do gene citocromo *b* (ABASSI et al., 2009; BOAKYE et al., 1999; BARTSCH et al., 2009; GARLAPATI et al., 2012; JIMÉNEZ et al., 2013; NGO; KRAME, 2003; KENT; NORRIS, 2005; QUARESMA et al., 2012; SANT'ANNA et al., 2008). Citocromo *b* é uma proteína bem caracterizada a partir de complexo III do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial, é a única proteína neste complexo codificado pelo genoma mitocondrial (IRWIN et al., 1991). O citocromo *b* é um dos citocromos envolvidos no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (ESPOSTI et al., 1993). É o

maior polipeptídeo do complexo bc1 do citocromo, que catalisa a transferência de elétrons de redox ubiquinona citocromo *c* (ESPOSTI et al., 1993; CROFTS et al., 1999).

Além da sua utilização para a identificação de fonte alimentar em artrópodes, este gene vem sendo empregado em estudos evolutivos de vertebrados (IRWIN et al., 1991; NGO; KRAMER, 2003). A utilização do gene citocromo *b* como marcador genético oferece vantagens devido a sua localização no genoma mitocondrial (que não sofre recombinação) e a disponibilidade de sequências completas no GenBank (PERKINS; SCHALL, 2002). Essas características tornam esse gene um dos principais marcadores utilizados para identificação da fonte alimentar de artrópodes vetores.

Diferentes técnicas moleculares (PCR e suas variantes) já foram empregadas para a identificação da fonte alimentar de artrópodes hematófagos (KENT, 2009). Recentemente, a PCR em tempo real foi utilizada para detecção de sangue de diferentes vertebrados em diversos artrópodes, a saber: pulgas (GRAHAM et al., 2012; 2013; WOODS et al., 2009), triatomíneos (MOTA et al., 2007) e mosquitos (VAN DEN HURK; SMITH; SMITH, 2007). Os resultados desses estudos claramente indicaram a superioridade da PCR em tempo real em relação às outras técnicas, em termos de sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados, por exemplo. De fato, uma das vantagens da PCR em tempo real é que ela possibilita a eliminação da etapa de pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), necessária para visualização do produto amplificado.

2 JUSTIFICATIVA

A introdução de ferramentas de biologia molecular na identificação da fonte alimentar tem revolucionado o estudo do comportamento alimentar de insetos hematófagos. A caracterização do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos baseada na detecção do DNA do hospedeiro por PCR em tempo real é uma alternativa promissora em relação às técnicas tradicionais (*e.g.*, precipitina), devido a sua alta sensibilidade e especificidade. O conhecimento sobre o padrão alimentar dos flebotomíneos é de grande importância para o entendimento da ecologia desses insetos e da epidemiologia das leishmanioses. Tais conhecimentos poderão contribuir na adoção de medidas de prevenção e controle dessas zoonoses.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Seria a técnica de PCR em tempo real capaz de detectar as principais fontes de repastos sanguíneos em fêmeas de *Lutzomyia* spp.?

4 HIPÓTESE

A PCR em tempo real é capaz de detectar as principais fontes de repastos sanguíneos em fêmeas de *Lutzomyia* spp.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Desenvolver protocolos de PCR em tempo real para a caracterização do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos.

5.2 Específicos

- a) Padronizar protocolos de PCR em tempo real para a caracterização do sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos;
- b) Avaliar a aplicabilidade da PCR em tempo real para a caracterização de fonte alimentar em flebotomíneos de campo;
- c) Identificar múltiplos repastos em flebotomíneos de campo por PCR em tempo real.

6 METODOLOGIA

6.1 Captura e triagem dos flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados nesse estudo foram coletados no âmbito de outros projetos realizados pelo grupo de pesquisa em eco-epidemiologia de leishmanioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Em particular, os espécimes foram coletados no município de Passira (07°59'42" S, 35°34'51" O), Agreste Setentrional do estado de Pernambuco.

As coletas foram realizadas utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas no final da tarde (17:00 horas) e retiradas pela manhã do dia seguinte (6:00 horas). Cada armadilha foi posicionada 1,5 metro do nível do chão, sendo instaladas em diferentes ecótopos (galinheiro, curral, plantação/chiqueiro e estábulo) no período de agosto de 2009 a agosto de 2010 (COSTA et al., 2013). Os espécimes capturados (n = 100) foram seccionados com o auxílio de estiletos entomológicos estéreis, sendo os dois últimos segmentos do abdome e a cabeça montados em lâminas com líquido de Berlese. A cabeça foi posicionada com a região ventral para cima, para uma melhor visualização das estruturas de interesse taxonômico, com o auxílio de um microscópio de luz. A identificação da espécie foi realizada de acordo com a classificação proposta por Young e Duncan (1994). Os abdomens das fêmeas alimentadas foram individualmente condicionados em tubos de microcentrífuga, com capacidade de 1,5 ml, a -20°C, até serem analisadas.

Fêmeas de flebotomíneos (n = 50) experimentalmente alimentadas em um roedor (*Rattus rattus*) foram mantidas em laboratório por diferentes intervalos de tempo (*i.e.*, 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 142 h) após o repasto de sangue. Em cada intervalo de tempo, cinco fêmeas foram selecionadas e submetidas à extração de DNA ou mantidas a -20°C até serem processadas.

6.2 Amostragem e aspectos éticos

Foi adotada uma amostragem não probabilística de conveniência (COSTA NETO, 1977; REIS, 2003). Esse estudo foi previamente licenciado (Projeto nº 55/2013) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Anexo A). O grupo de pesquisa em leishmanioses possui a autorização do pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (Projeto nº 28/2013) (Anexo B) e a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (Projeto nº 12749-2) (Anexo C). As

amostras de sangue dos animais que foram utilizadas na pesquisa foram coletadas pelo médico veterinário responsável e o proprietário do animal assinou um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

6.3 Coleta de sangue

Para padronização da PCR em tempo real, amostras de sangue venoso de alguns animais foram coletadas: cão (CLF), gato (FC), rato (RR), cavalo (EC), galinha (GG) e homem (HS). Os animais do estudo foram provenientes de fazendas, laboratórios ou residências. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo solução anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 ml de sangue) e estocadas em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

6.4 Extração de DNA

Para extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas e de amostras de sangue de cada fonte estudada foi utilizado os kits comerciais DNeasy Blood & Tissue kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, USA) (QIAGEN®, USA), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram eluídas em 100 μl de tampão Tris-EDTA e congeladas a -80°C . A quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

6.5 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados com base nas sequências polimórficas do gene citocromo *b* disponíveis no GenBank [cão (JF489119.1), gato (AB194817.1), rato preto (AB194817.1), cavalo (JF511458.1), galinha (EU839454.1) e homem (KC711458.1)], utilizando a ferramenta Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Os *primers*, contendo de 20 a 24 pb cada, foram desenhados e analisados com base na especificidade, temperatura de *melting* (T_m $57-63^{\circ}\text{C}$), tamanho do produto (70–120 pares de base - pb) e o percentual de guanina e citosina (% de GC) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos *primers* desenhados para desenvolvimento dos protocolos de PCR em tempo real.

Hospedeiro	<i>Primers</i>	% de CG	Start	Stop	T _m (°C)	Tamanho do produto (pb)
Cão	f5' - AGCGCCGTCTAACATCTCTG - 3'	55,45	66	85	55,90	118
	r5' - TGTGGCTGTGTCCGATGTAT - 3'	50,89	183	164	59,10	
Cavalo	f5' - CAGCCAGTGGAACACCCATA- 3'	55,00	1021	1040	59,67	103
	r5' - TGTTTTTCGATGGTGCTTGCG - 3'	50,00	1123	1104	60,04	
Gato	f5' - AGAATGGATCTGAGGGGGCT - 3'	55,00	4835	502	60,03	108
	r5' - AGGTGTACTGCTGCTAAGGC - 3'	55,00	90	571	59,75	
Galinha	f5' - CAGCAGACACATCCCTAGCC - 3'	60,00	170	189	60,18	104
	r5' - GAAGAATGAGGCGCCGTTTG - 3'	55,00	273	254	60,18	
Homem	f5' - AGGCGTCCTTGCCCTATTAC- 3'	55,00	63	82	59,53	104
	r5' - GTGATTGGCTTAGTGGGCG - 3'	55,00	166	147	60,39	
Roedor	f5' - GAATTGGGGGCCAACCAGTA - 3'	55,00	1033	1052	59,00	109
	r5' - TCAATGATTCCGGAGATTGGT - 3'	42,86	1141	1121	57,00	

Fonte: A autora.

6.6 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o ABI PRISM 7000[®] (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados utilizando o software v2.3 (Applied Biosystems). Três concentrações dos *primers* foram inicialmente avaliadas (8 pmol/μl, 5 pmol/μl e 3 pmol/μl) para determinar a melhor concentração de funcionamento dos sistemas.

Inicialmente, cada reação conteve um volume final de 50 μl, incluíram 2 μl da amostra de DNA testada, 1 μl de cada *primer* e 25 μl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Algumas reações foram também realizadas em um volume final de 25 μl (ou seja, 8,5 μl de tipo 1 de água, 1 μl de primer (5 pmol), 12,5 μl de SYBR Green PCR Master Mix e 2 μl de DNA testado).

A reação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação (95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto). Água livre de DNA foi usada como *no template control* (NTC), fêmeas não ingurgitadas ou machos como controle negativo e curvas de DNA de cada fonte como controle positivo foram incluídos. O software ABI PRISM[®] 7000 SDS (versão 1.1) foi utilizado para análise dos resultados. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Nos resultados a soma dos percentuais das fontes alimentares é maior que 100%, pois algumas fêmeas de flebotomíneos se alimentaram de sangue de mais de um hospedeiro.

6.6.1 Sensibilidade analítica, eficiência e especificidade

Para avaliação da sensibilidade analítica (limite de detecção) foi utilizada uma curva de diluições seriadas de DNA genômico (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg por 2 μl) de cada animal. O limite de detecção do ensaio foi definido como sendo a menor quantidade de DNA alvo detectável (TOO, 2003).

A eficiência foi determinada de acordo com Too (2003), por meio da seguinte fórmula: $\varepsilon = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1 + \varepsilon)^{\Delta C_t}$, onde o ΔC_t é determinado pela diferença dos valores dos C_t s (*Cycle threshold*) da amostra definida como alvo e das amostras em teste (TOO, 2003). Assim, foi realizado um cruzamento entre dos *primers* com diferentes amostras (alvo). Para uma amostra ser enquadrada como positiva, foram definidos alguns critérios: duplicatas homogêneas; curva de amplificação (C_t inferior ao NTC); e curva de dissociação (derivativa superior ao NTC). O ponto de corte (*cutoff*) foi

definido como o valor de Ct, correspondente ao limite de detecção inferior do protocolo. Qualquer valor de Ct acima deste limite de detecção foi considerado negativo juntamente com análise da temperatura de melting (em comparação com o padrão).

6.7 Sequenciamento

O produto da PCR em tempo real de cinco espécimes positivos para cada hospedeiro foram purificados em coluna do kit Pure Link PCR Purification (Invitrogen[®]) seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado o kit BioDye Terminator Cycle Sequencing (versão 3.1) (Applied Biosystems) em um seqüenciador automático (ABI 3100 Genetic Analyzer) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/PE.

6.8 Análise dos dados

Os dados foram tabulados e as frequências calculadas com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007[®].

7 RESULTADOS

7.1 Sensibilidade analítica, eficiência e especificidade

Dentre as três concentrações dos *primers* avaliadas (8 pmol/μl, 5 pmol/μl e 3 pmol/μl) para determinar a melhor concentração de funcionamento dos protocolos, 5 pmol/μl foi a que apresentou melhor desempenho.

Utilizando uma curva de diluição (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg por 2 μl) do DNA obtido de amostras de sangue da cada espécie animal, verificou-se que o limite de detecção dos protocolos direcionados ao DNA de cão (CLF), rato (RR) e gato (FC) foi de 1 pg. O protocolo direcionado ao homem (HS) detectou até 100 fg de DNA ao passo que aqueles para galinha (GG) e cavalo (EC) tiveram sensibilidade analítica de 10 pg (Tabela 2).

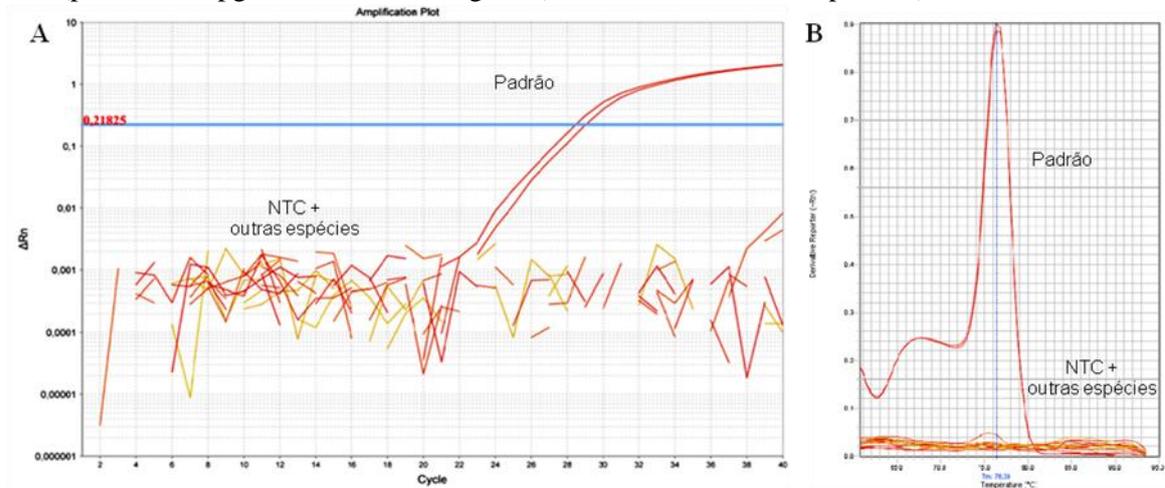
Tabela 2 – Coeficiente de determinação (R^2), eficiência (ϵ) e coeficiente angular da reta (*slope*) das curvas padrão por tipo de sangue.

Hospedeiro	<i>Slope</i>	R^2	ϵ (%)	Limite de detecção (por 2 μl)
Cão	-3,58±0,69	0,93±0,10	96,3±30,8	1 pg
Cavalo	-3,88±0,61	0,96±0,02	83,28±14,74	10 pg
Gato	-3,37±0,16	0,93±0,02	96,89±4,13	1 pg
Roedor	-4,29±0,16	0,94±0,04	71,06±3,32	1 pg
Galinha	-3,65±0,65	0,96±0,06	92,61±27,24	10 pg
Humano	3,84±0,53	0,83±0,23	84,17±15,74	100 fg

Fonte: A autora.

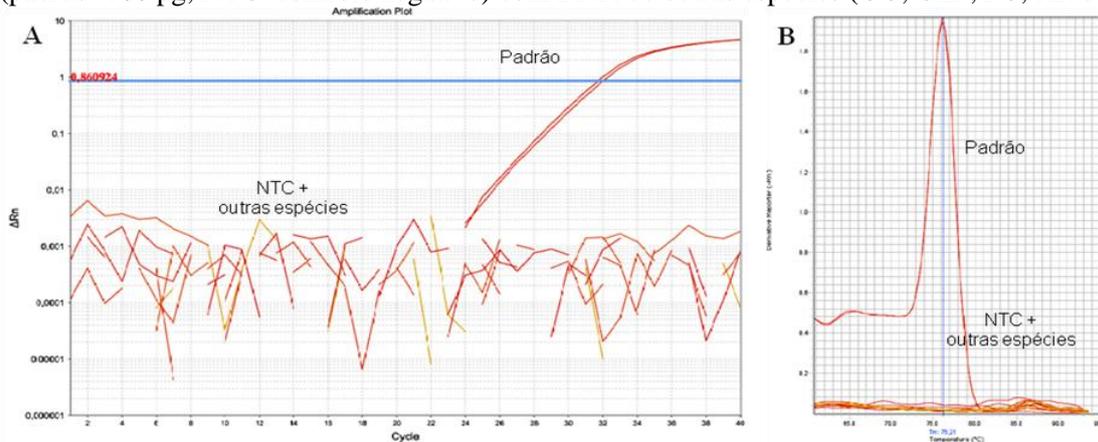
Através dos testes cruzados, todos os *primers* demonstraram um bom desempenho, onde a amplificação das amostras foi específica para cada o alvo, com ausência de amplificação do NTC e dos controles negativos (fêmeas não alimentadas). Os protocolos para CLF, EC e RR, por exemplo, demonstraram 100% de especificidade para DNA do alvo (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 - Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para CLF (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, EC, FC, RR e HS).



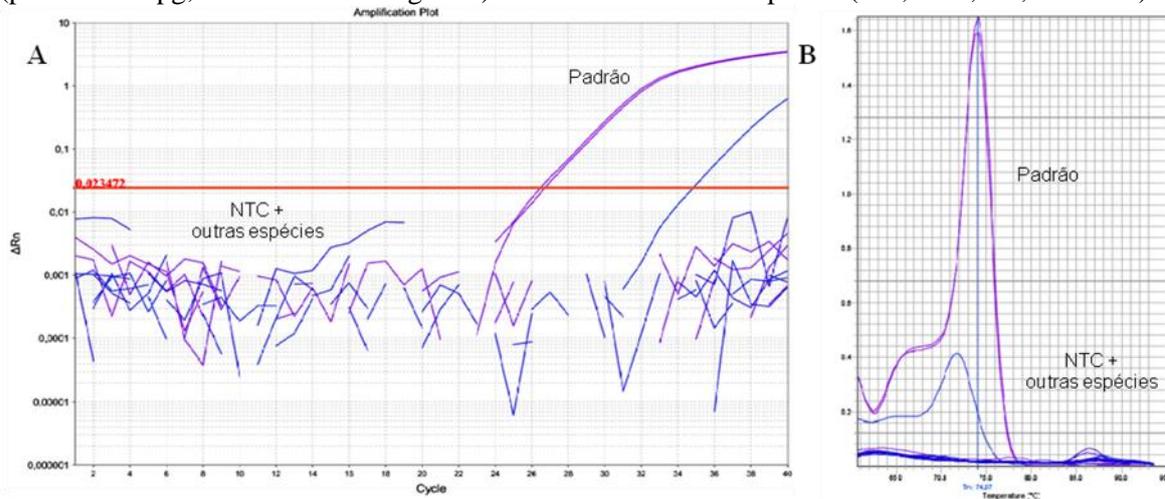
Fonte: A autora.

Figura 4 - Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para EC (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, CLF, FC, RR e HS).



Fonte: A autora.

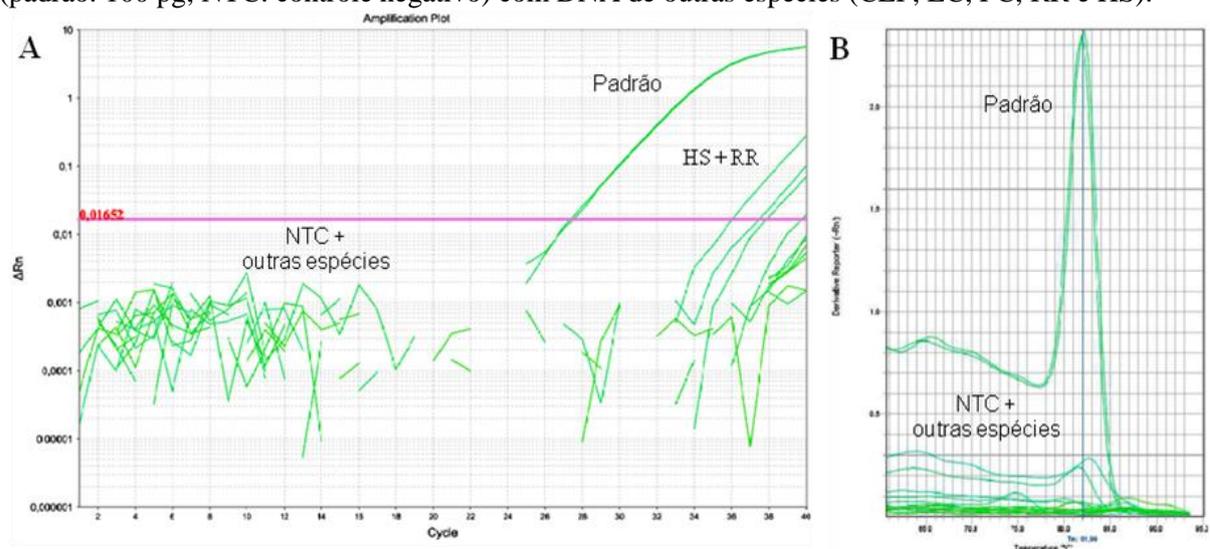
Figura 5 - Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para RR (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (GG, CLF, FC, EC e HS).



Fonte: A autora.

Amplificações não específicas ocorreram em alguns casos. O protocolo para GG amplificou o DNA de RR (Ct 37,6) e HS (Ct 36,2-37,9) (Figura 6); os *primers* de FC amplificaram DNA de EC (Ct 37,2-38,6), CLF (Ct 35,9-38,2), RR (Ct 38,0-38,2), GG (34,8-35,2) e HS (Ct 34,4-34,7); e os *primers* de HS amplificaram DNA de CLF (37,1), FC (Ct 31,0-32,0) e RR (35,7-36,1). No entanto, estas amplificações não específicas puderam ser distinguidas pelo valor de Ct (acima do definido como limite inferior de detecção de cada ensaio correspondente) e/ou por análise da curva de *melting* (em comparação com o padrão). Além disso, a especificidade dos ensaios foi também confirmada por análise da sequência de DNA, que mostrou níveis elevados de identidade (96-100%) das sequências obtidas nesse estudo com sequências correspondentes disponíveis no GenBank (número de acesso: KJ185407.1, KF282339.1, KF964328.1, AB194817.1, KF038166.1, e KJ522809.1).

Figura 6 - Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do protocolo de PCR em tempo real para GG (padrão: 100 pg; NTC: controle negativo) com DNA de outras espécies (CLF, EC, FC, RR e HS).

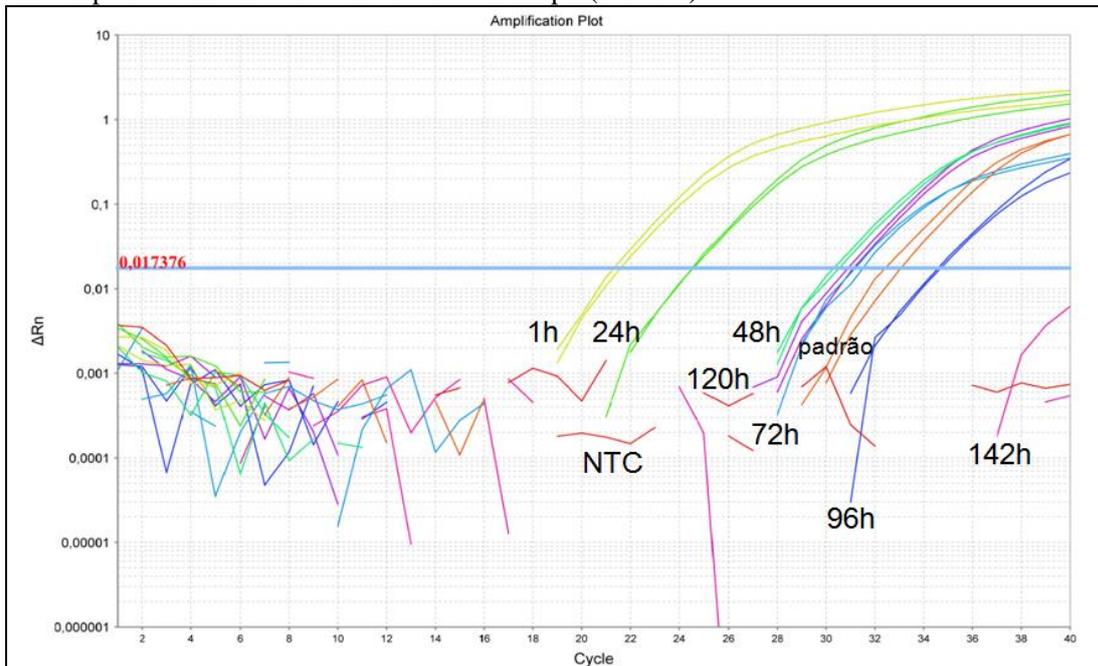


Fonte: A autora.

7.2 Detecção das fontes alimentares em flebotomíneos

Testes para avaliar a capacidade de detecção da técnica ao longo do tempo, mostraram que a técnica de PCR em tempo real visando DNA de RR foi capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do hospedeiro até 5 dias (120 horas) após o repasto sanguíneo (Figura 7).

Figura 7 – Detecção de DNA de rato (padrão: 1 pg DNA de roedor; NTC: controle negativo) por PCR em tempo real em diferentes intervalos de tempo (1-142 h).



Fonte: A autora.

7.2 Detecção das fontes alimentares em flebotomíneos

Em relação às 100 fêmeas ingurgitadas de campo, 91% foram positivas para o DNA dos hospedeiros estudados. Em particular, 73% das fêmeas continham sangue de humano, 23% de galinha, 22% de cão, 15% de cavalo, 11% de rato e 2% de gato. Curiosamente, 76,1% das fêmeas de *L. longipalpis* se alimentaram de sangue humano, seguido por galinha (19,6%), cão (16,3%), cavalo (16,3%), rato (12%) e gato (2,2%). O espécime de *L. lenti* foi positivo para sangue de cão. As fêmeas de *L. migonei* se alimentaram de sangue de cão (85,71%), galinha (71,43%) e humano (42,86%).

No total, 48% das fêmeas de flebotomíneos de campo foram positivas para uma espécie animal, 31% para duas e 12% para três. Entre as fêmeas que haviam se alimentado de uma fonte de sangue, à maioria continha sangue humano (73%), seguido por galinha (10,4%) e cão (6,2%). Entre aqueles alimentados em duas fontes de sangue, a maioria deles foi positiva para: humano + cavalo (n = 7), humano + galinha (n = 7), humano + cão (n = 8), rato + humano (n = 4) e cão + galinha (n = 4). Finalmente, a maioria das fêmeas alimentadas com três fontes foi positiva para humano + cão + galinha (n = 5), seguido de cavalo + humano + rato (n = 3), cão + gato + humano (n = 1), galinha + humano + cavalo (n = 1), humano + rato + cão (n = 1) e humano + galinha + rato (n = 1).

8 DISCUSSÃO

No presente estudo foram desenvolvidos ensaios de PCR em tempo real utilizando SYBR Green como fluoróforo, para identificação de sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos. Os ensaios foram capazes de detectar pequenas quantidades de DNA do hospedeiro em fêmeas de campo que estavam armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 4 anos. De fato, o bom desempenho dos ensaios aqui desenvolvidos permitiu, por exemplo, a detecção de 100 fg de DNA de humano. O limite de detecção dos ensaios foi equivalente ao relatado por alguns autores (ABBASI et al., 2009; HAOUAS et al., 2007). Isso confirma a utilidade do gene citocromo *b* como um alvo genético em ensaios de PCR em tempo real para identificação do repasto sanguíneo em flebotomíneos, como anteriormente demonstrado por PCR convencional (ABBASI et al., 2009; GARLAPATI et al., 2012; JIMÉNEZ et al., 2013; TIWANANTHAGORN et al., 2012). A utilização desse alvo também foi bem sucedida para detecção de sangue de hospedeiros em outros insetos como mosquitos (NGO; KRAME, 2003; BARTSCH et al., 2009; KENT; NORRIS, 2005; PETTERSSON et al., 2013), simulídeos (BOAKYE et al., 1999) e barbeiros (MOTA et al., 2007).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para detectar sangue em artrópodes vetores, como mosquitos (KENT, 2009), mas algumas diferenças biológicas tornam difícil extrapolar os resultados para flebotomíneos, incluindo a quantidade de sangue ingerido por mosquitos (2-6 μl) (CLEMENTES, 1992) e flebotomíneos (1 μl ou menos) (DABA et al., 2004). Além disso, o processo de digestão do sangue em insetos hematófagos pode resultar na desnaturação do DNA e, por conseguinte, prejudicar a detecção da fonte alimentar, alguns dias após o repasto sanguíneo (KENT; NORRIS, 2005; SANT'ANNA et al., 2008). Assim, é desejável dispor de uma técnica que seja suficientemente sensível para permitir a detecção de quantidades mínimas de DNA, até alguns dias após a ingestão de sangue, uma vez que é difícil de estimar o tempo decorrido desde o último repasto, em especial em fêmeas coletadas no campo sem sangue visível no abdômen. Muitos dos estudos para detecção de sangue em insetos visam compreender o comportamento alimentar de vetores de patógenos de importância médica e veterinária (KENT, 2009).

Os resultados dos experimentos sobre a detecção em diferentes intervalos de tempo aqui obtidos demonstram a robustez dos ensaios, permitindo a detecção de DNA de roedor até 5 dias após o repasto sanguíneo. Esses resultados estão consistentes com outros estudos sobre a identificação de sangue em flebotomíneo, que geralmente relatam uma capacidade de detecção do DNA do hospedeiro por 1 a 4 dias (ABBASI et al., 2009; GARLAPATI et al.,

2012; HAOUAS et al., 2007; KENT; NORRIS, 2005; SANT'ANNA et al., 2008; VALINSKY et al., 2014). Os ensaios com PCR heteroduplex desenvolvidos para identificar sangue de aves em mosquitos foram capazes de detectar o DNA do hospedeiro por até 7 dias (LEE et al., 2002). Os autores sugeriram que a maior quantidade de DNA no sangue de aves (devido à presença de eritrócitos nucleados) persiste por um período maior do que o DNA de sangue de mamíferos.

No presente estudo a maioria das fêmeas pertencentes à espécie *L. longipalpis* analisadas foram positivas para sangue humano, seguido por galinhas, cães, cavalos, ratos e gatos. Curiosamente, a maioria das fêmeas de *L. longipalpis* de campo foi coletada em galinheiros perto de habitações humanas. O comportamento antropofílico desse vetor é bastante evidenciado, assim como seu eclético hábito alimentar, sendo ainda considerada uma espécie de fácil adaptação a ambientes modificados pelo homem (LAINSON; RANGEL, 2005; RANGEL; VILELA, 2008). Um estudo realizado no Rio Grande do Norte, em áreas onde a LV é endêmica, foram encontrados espécimes de *L. longipalpis* alimentados de humano, porco, cavalo, cão, gato, galinha e gambás (MACEDO-SILVA et al., 2014). No Maranhão, foram encontradas fêmeas positivas para sangue de galinha e roedor, seguidos de humano, cão e equino (DIAS; LOROSA; REBÊLO, 2003). Já no Mato Grosso, as fêmeas de *L. longipalpis* se alimentaram predominantemente em aves e roedores, mas também foram encontrados exemplares com sangue de humanos, gambás, bois, cavalos e cães (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). Os dados da literatura, atrelados aos resultados do presente estudo, denotam o caráter oportunista de *L. longipalpis*, favorecendo, inclusive, a transmissão de patógenos.

A proximidade do homem a áreas de floresta e a criação de animais domésticos pode favorecer a atração de flebotomíneos ao peridomicílio (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). Vale ressaltar que os animais domésticos estão entre as fontes de sangue mais frequentes de flebotomíneos no ambiente peri-doméstico. Embora sejam primariamente associados a ambientes naturais, os flebotomíneos podem eventualmente se estabelecer no peri-domicílio ou até mesmo no interior das casas, representando um risco para a população local.

Embora a preferência de certos flebotomíneos para uma determinada espécie animal ou grupo (por exemplo, mamíferos ou aves) possa variar, o comportamento seletivo de algumas espécies tem sido reconhecido. Por exemplo, em um estudo realizado em Belém do Pará, *L. flaviscutellata* foi a espécie predominantemente encontrada se alimentando de roedores (SHAW; LAINSON, 1968). Apesar disso, a maioria das espécies de flebotomíneos, para as quais existe informação disponível, parece ser generalista e não especialista em sua

escolha de hospedeiros (BAUM et al., 2013; GUY et al., 1984; MACEDO-SILVA et al., 2014; NGUMBI et al., 1992; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

No presente estudo, 19,2% das fêmeas de *L. longipalpis* positivas para sangue de humano também foram positivas para o sangue de galinha. As aves possuem características fisiológicas (e.g., elevada temperatura corporal) que as tornam refratárias a infecção por *Leishmania* (OTRANTO et al., 2010; ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994). Assim, foi sugerido que as galinhas poderiam atuar como agentes zooprofiláticos, reduzindo a infecção por *Leishmania* em flebotomíneos que delas se alimentassem (ALEXANDER et al., 2002). Porém, um estudo demonstrou que o sangue de galinhas não é prejudicial ao desenvolvimento de *Leishmania mexicana* em *L. longipalpis* (SANT'ANNA et al., 2010). A atração dos flebotomíneos por galinhas foi observada em vários estados brasileiros (AGUIAR; VILELA; LIMA, 1987; BARATA et al., 2005; COSTA et al., 2013; DANTAS-TORRES; ALMEIDA; BRANDÃO-FILHO, 2006). De fato, a presença de galinheiros no peri-domicílio tem sido frequentemente apontada como um fator de risco para a LV (ALEXANDER et al., 2002). Ademais, em algumas situações as galinhas podem facilitar a aproximação dos flebotomíneos a outros animais, por exemplo, ao homem e ao cão, visto que geralmente os galinheiros são construídos próximos às residências. De fato, pelo menos quatro das 92 fêmeas de *L. longipalpis* analisadas no presente estudo, haviam se alimentado de humano, cão e galinha. Certamente, os protocolos de PCR em tempo real desenvolvidos no presente estudo poderão ajudar a entender o comportamento alimentar de flebotomíneos vetores e direcionar as medidas de controle, como por exemplo, a remoção de galinheiros próximos às habitações humanas (ALEXANDER et al., 2002).

9 CONCLUSÕES

Os protocolos de PCR em tempo real padronizados nesse estudo permitiram a detecção de pequenas quantidades de DNA de *Rattus rattus* em fêmeas de flebotomíneos alimentadas, até cinco dias após o repasto sanguíneo. Portanto, conclui-se que a PCR em tempo real é uma ferramenta capaz de identificar as principais fontes de repastos sanguíneos em fêmeas de *Lutzomyia* spp., com sensibilidade analítica e especificidade satisfatórias. Como perspectiva, novos estudos para melhorar a eficiência dos protocolos aqui desenvolvidos para fins de quantificação do DNA do hospedeiro em fêmeas de flebotomíneos de campo são necessários. Da mesma forma, o refinamento desses protocolos para a detecção simultânea do DNA de diferentes hospedeiros e de *Leishmania* spp. em flebotomíneos seria de grande valia em termos de custo-benefício. Nesta perspectiva, o uso de sondas TaqMan e, talvez, a concepção de novos oligonucleotídeos iniciadores (por exemplo, para gatos) seria apropriado para aumentar a especificidade do ensaio.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, I. et al. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 9, n, 1, p. 79-86, 2009.
- ADLER, S.; THEODOR, O. On the *minutus* group of the genus *Phlebotomus* in Palestine. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 16, n. 4, p. 399-405, 1926.
- AFONSO, M. M. et al. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1816-1820, 2005.
- AGRELA, I. et al. Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 39, n. 3, p. 440-445, 2002.
- AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B. Ecology of the sandflies of Itaguaí, in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Feed preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 583-584, 1987.
- ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 88, n. 5, p. 543-549, 1994.
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.
- ALEXANDER, B. et al. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its the incidence. **PLoS One**, San Francisco v. 7, n. 5, p. 11-12, 2012.
- ANAGNOSTOU, V. et al. Novel phlebovirus in a febrile child, Greece. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 940-941, 2011.
- ANDRADE, M. S. et al. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, 2005.
- BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.
- BARRAL, A.; COSTA, J. (Ed.). **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. Salvador: CNPq: Fiocruz-BA, 2011.

- BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, London, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.
- BARTSCH, S. et al. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 3, p. 373-380, 2009.
- BASAK, S. et al. Reviewing Chandipura: a vesiculovirus in human epidemics. **Bioscience Reports**, New York, v. 27, n. 4/5, p. 275-298, 2007.
- BATES, P. A. et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 8, p. 131, 2015.
- BAUM, M. et al. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 560-565, 2013.
- BOAKYE, D. A. et al. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome b heteroduplex analysis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 282-287, 1999.
- BONGIORNO, G. et al. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta Tropica**, Basel, v. 88, n. 2, p. 109-116, 2003.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- 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.
- CARHAN, A. et al. Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 48, n. 4, p. 264-269, 2010.
- CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010.
- CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes: development structure and reproduction**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1.

COLLAO, X. et al. Granada virus: a natural phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 83, n. 4, p. 760-765, 2010.

COLLINS, F. **Fêmea de flebotomíneo**. 2011. 1 fotografia.

COLMENARES, M. et al. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 32, n. 3, p. 229-233, 1995.

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

COMER, J. A.; TESH, R. B. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. **Parassitologia**, Roma, v. 33, n. 1, p. 143-150, 1991.

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

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977.

COSTA, P. L. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 126, n. 2, p. 99-102, 2013.

CROFTS, A. R. et al. Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc(1) complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 18, p. 10021-10026, 1999.

DABA, S. et al. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v. 34, n. 1, p.173-182, 2004.

DA-CRUZ, A. M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 697-712.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 733-736, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, F. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandflies of an urban focus of visceral leishmaniasis, Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical**, Goiana, v. 35, n. 2, p. 157-160, 2006.

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.

- DESCOTEAUX, A.; TURCO, J. S. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1455, n. 2/3, p. 341-352, 1999.
- DHANDA, V. et al. Isolation of Chandipura virus from sandflies in Aurangabad. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 58, n. 2, p. 179-180, 1972.
- DIAS, F. O. P. et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.
- ESPOSTI, M. D. et al. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1143, n. 3, p. 243-271, 1993.
- FEITOSA, M. A. C.; CASTELLÓN, E. G. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 24, p. 539-548, 2006.
- FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.
- FERRO, C. et al. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 34, n. 6, p. 719-728, 1997.
- FONTENELES, R. S. et al. Blood feeding preference of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) in a transmission area for American cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 647-650, 2009.
- FORATTINI, O. P. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. In: _____. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v. 4, p. 658.
- GAIDAMOVICH, S. I. et al. Natural foci of viruses borne by *Phlebotomus papatasi* in the U.S.S.R. according to a serologic study of the population. **Voprosy Virusologii**, Moscow, n. 5, p. 556-560, 1978.
- GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. **Boletín de la Dirección de Malariología y Ambiental**, Maracay, v. 35, n. 1, p.133-142, 1995.
- GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 23-51.
- GARLAPATI, R. B. et al. Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 49, n. 3, p. 515-521, 2012.

GEEVARGHESE, G. et al. Detection of *Chandipura virus* from sandflies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, n. 3, p. 495-496, 2005.

GOMEZ, B.; SANCHEZ, E.; FELICIANGELI, M. D. Man-vector contact of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno CA, v. 14, n. 1, p. 28-32, 1998.

GRAHAM, C. B. et al. Combining real-time polymerase chain reaction using SYBR Green I detection and sequencing to identify vertebrate blood meals in fleas. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 49, n. 6, p. 1442-1452, 2012.

GRAHAM, C. B. et al. Blood meal identification in off-host cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from a plague-endemic region of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 88, n. 2, p. 381-389, 2013.

GUY, M. W. et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. **Annales de Parasitologie Humaine et Compare**, Paris, v. 59, n. 5, p.449-458, 1984.

HAOUAS, N. et al. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir host by blood meal analysis in the vectors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore v. 77, n. 6, p. 1054-1059, 2007.

IRWIN, D. M. et al. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.

JAVADIAN, E. et al. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. III. Host-feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* in an endemic area of the disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26 n. 2, p. 294-298, 1977.

JIMÉNEZ, M. G. E. et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 7, p. 2453-2459, 2013.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KENT, R. J. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 4-18, 2009.

KENT, R. J.; NORRIS, D. E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 336-342, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KING, W. V.; BULL, C. G. The blood feeding habits of malaria carrying mosquitoes. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 3, n. 9, p. 497-513, 1923.

KOCAK TUFAN, Z. et al. Clinical and laboratory findings of a sandfly fever Turkey virus outbreak in Ankara. **Journal of Infection**, London, v. 63, n. 5, p. 375-381, 2011.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier, Balows, Sussman (Eds). **TOPLEY & WILSON' S. Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. 9. ed. London: Arnold, 1998. v. 5, p. 241-266.

LEE, J. H. et al. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction heteroduplex analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 5, p. 599-604, 2002.

LEWIS, D. F. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History) - Entomology**, London, v. 45, n. 2, p. 121-209, 1982.

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

MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 51, n. 1, p. 237-344, 2014.

MARASSÁ, A. M. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method standardization, for identification of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* bloodmeals (Lutz & Neiva). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 6, p. 441-446, 2004.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 127-147, 2013.

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

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. S. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato

Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MORALES, A.; BELLO, F.; CARDENAS, E. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. **Revista Ciencias de La Salud**, Bogotá, v. 3, n. 2, p. 129-135, 2005.

MORRISON, A. C. et al. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

MOTA, J. et al. Identification of blood meal source and infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas disease vectors using a multiplex cytochrome b polymerase chain reaction assay. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, NY, v. 7, n. 4, p. 617-627, 2007.

MOUREAU, G. et al. Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from northern Algeria. **Open Virology Journal**, Hilversum, n. 4, p. 15-21, 2010.

MUNIZ, L. H. G. et al. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil Host feeding preferences of sandflies in rural area, Southern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1087-1093, 2006.

NERY, L. C. et al. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 571-574, 2004.

NGO, K. A.; KRAMER, L. D. Identification of mosquito blood-meals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, n. 2, p. 215-222, 2003.

NGUMBI, P. M. et al. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Barikrame District, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 385-388, 1992.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Feeding preference of sand flies in the Amazon, Maranhão State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 9, p. 2183-2186, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

OTRANTO, D. et al. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, n. 1, p. 80-83, 2010.

PAPA, A.; VELO, E.; BINO, S. A novel phlebovirus in Albanian sandflies. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v.17, n. 4, p. 582-587, 2010.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from *cytochrome b* gene sequences. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 5, p. 971-978, 2002.

PETTERSSON, E. et al. Molecular identification of bloodmeals and species composition in *Culicoides* biting midges. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 104-112, 2013.

PIMENTA, P. F. P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, Cambridge, v. 115, n. 4, p. 359-369, 1997.

PIMENTA, P. F. P. et al. Interação vetor hospedeiro: interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 275-289.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

QUARESMA, P. F. et al. Natural *Leishmania* spp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 480-485, 2012.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses: distribuição de habitats. In: _____. **Flebotomíneos do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 240-245.

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**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RANGEL, E.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotominae*) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 16, n. 5, p. 413-423, 1979.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 58, p. 227-250, 2013.

REIS, J. C. **Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária**. 1. ed. Olinda: O autor, 2003.

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

- RIBEIRO, J. M. C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodinus prolixus*. **Biochemical Journal**, London, v. 308, n. 1, p. 243-249, 1995.
- RICE, J. B.; BARBER, M. A. Malaria studies in Greece. A modification of the Uhlenhut-Weidanz precipitin test for determining the source of blood meals in mosquitoes and other insects. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 20, n. 8, p. 876-883, 1935.
- ROSSI, E. et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropica**, Basel, v. 105, n. 2, p. 158-165, 2008.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, Washington, DC, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.
- SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, n. 1, p. 84-87, 2010.
- SANCHEZ CLEMENTE, N. et al. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e1819, 2012.
- SANGIORGI, B. et al. Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia state, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, London, v. 2012, p. 1-5, 2012.
- SANT'ANNA, M. R. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 3, p. 230-237, 2008.
- SANT'ANNA, M. R. et al. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. **Parasites & Vectors**, London, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2010.
- SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.
- SECUNDINO, N. F. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.
- SECUNDINO, N. F. C. et al. A biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: BARRAL, A.; COSTA, J. (Ed.). **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. Salvador: CNPq; Fiocruz-BA, 2011. p. 90-101.
- SHAW, J. et al. Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.) **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 337-353.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the Lower Amazon Region the feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 62, n. 3, p. 396-405, 1968.

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.

SILVA, D. F. et al. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 138-144, 2007.

SILVA, V. C. et al. ELISA não diferencia sangue de cão doméstico de sangue de raposa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 1, p. 757, 2001.

SILVA, V. C. **Identificação de reservatórios de zoonoses em insetos vetores por espectrometria de massa**. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SVOBODOVÁ, M. et al. Short report: distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in sanliurfa, Turkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 6-9, 2003.

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. et al. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 20, n. 1, p. 150-156, 1971.

TESH, R. B. et al. Further studies on the natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 95, n. 1, p. 88-93, 1972.

TESH, R. B. et al. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 54, n. 6, p. 663-674, 1976.

TESH, R. et al. Isfahan virus, a new vesiculovirus infecting humans, gerbils, and sandflies in Iran. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, n. 2, p. 299-306, 1977.

TICONA, E. et al. The pathophysiology of the acute phase of human bartonellosis resembles AIDS. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v. 74, n. 1, p. 45-49, 2010.

TIWANANTHAGORN, S. et al. Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 125-133, 2012.

- TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 146-154, 2003.
- VALINSKY, L. et al. Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 51, n. 3, p. 678-685, 2014.
- VAN DEN HURK, A. F.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays to identify mosquito (Diptera: Culicidae) bloodmeals originating from native Australian mammals. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 1, p. 85-92, 2007
- WALTERS, L. L. et al. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 30, n. 1, p. 179-198, 1993.
- WALTERS, L. L. et al. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 32, n. 5, p. 711-725, 1995.
- WOODS, M. E. et al. Identification of flea blood meals using multiplexed real-time polymerase chain reaction targeting mitochondrial gene fragments. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 6, p. 998-1003, 2009.
- WHO EXPERT COMMITTEE. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 2010, 940p. (WHODOC: an Index to WHO Technical Documents).
- 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**, Gainesville, v. 54, p. 180-881, 1994.
- ZHIOUA, E. et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sand flies collected in Tunisia. **Journal of General Virology**, London, v. 91, n. 5, p. 1275-1283, 2010.
- ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 449-470, 1994.

APÊNDICE A - TCLE
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Utilização de PCR em tempo real para caracterização das fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em regiões endêmicas para as leishmanioses no Estado de Pernambuco, Brasil.

Eu, _____, RG _____,
 proprietário do animal _____, espécie _____,
 residente à rua/Av. _____,
 bairro _____, cidade/estado _____, CEP: _____

aceito participar desse estudo, cujo objetivo é desenvolver um método de identificação de fonte alimentar de flebotomíneo (“mosquito palha”). Fui informado que meu animal será submetido à coleta de sangue para os testes em laboratório, sem que haja nenhum dano à saúde do mesmo. A coleta de sangue será realizada com uso de agulha e seringa e, o animal poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na pele, sendo retirado de 3 a 5 mL de sangue, o equivalente a 1 colher de chá; este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias. Durante a assinatura deste termo fui informado que as amostras coletadas serão incorporadas ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão por tal. Estou ciente que não haverá incentivo financeiro para participação nesta pesquisa, que este documento é emitido em duas vias, uma ficará comigo e outra com a equipe de pesquisa, tenho garantida de que não haverá divulgação de minha identidade ou de meu animal nos produtos gerados por este projeto.

Contatos: **Dr. Filipe Dantas Torres, CPqAM/FIOCRUZ – Tel. (81) 2101-2551**

 Sujeito da pesquisa

 Coordenador do projeto

Recife, ____/____/____

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO

Sales et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:230
 DOI 10.1186/s13071-015-0840-3



RESEARCH

Open Access

Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR

Kamila Gaudêncio da Silva Sales¹, Pietra Lemos Costa¹, Rayana Carla Silva de Morais¹, Domenico Otranto², Sival Pinto Brandão-Filho¹, Milena de Paiva Cavalcanti¹ and Filipe Dantas-Torres^{1,2*}

Abstract

Background: Phlebotomine sand flies are blood-feeding insects of great medical and veterinary significance acting as vectors of *Leishmania* parasites. Studying the blood-feeding pattern of these insects may help in the understanding of their interactions with potential reservoir hosts of *Leishmania* parasites. In this study, we developed real time PCR assays for the identification of sand fly blood meal.

Methods: Six pairs of primers were designed based on *cytochrome b* gene sequences available in GenBank of the following potential hosts: dog, cat, horse, chicken, black rat, and human. Firstly, SYBR Green-based real time PCR assays were conducted using a standard curve with eight different concentrations (i.e., 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg and 1 fg per 2 µl) of DNA samples extracted from EDTA blood samples from each target animal. Then, DNA samples extracted from field-collected engorged female sand flies belonging to three species (i.e., *Lutzomyia longipalpis*, *L. migonei* and *L. leni*) were tested by the protocols standardized herein. Additionally, female sand flies were experimentally fed on a black rat (*Rattus rattus*) and used for evaluating the time course of the detection of the protocol targeting this species.

Results: The protocols performed well with detection limits of 10 pg to 100 fg. Field-collected female sand flies were fed on blood from humans (73%), chickens (23%), dogs (22%), horses (15%), black rats (11%) and cats (2%). Interestingly, 76.1% of the *L. longipalpis* females were positive for human blood. In total, 48% of the tested females were fed on single sources, 31% on two and 12% on three. The analysis of the time course showed that the real time PCR protocol targeting the black rat DNA was able to detect small amounts of the host DNA up to 5 days after the blood meal.

Conclusions: The real time PCR assays standardized herein successfully detected small amounts of host DNA in female sand flies fed on different vertebrate species and, specifically for the black rats, up to 5 days after the blood meal. These assays represent promising tools for the identification of blood meal in field-collected female sand flies.

Keywords: Phlebotomine sand flies, Blood meal, Brazil, Real time PCR

Background

Phlebotomine sand flies are blood-feeding insects of great medical and veterinary significance, due to their ability to transmit bacteria, virus, and protozoa to humans and animals [1]. Indeed, besides water and carbohydrates for flight and general metabolism, female sand flies almost always need to take a blood meal for the protein supplementation for egg production [2]. While the preference of certain species of sand flies for a given animal species or group (e.g., mammals or birds)

may vary widely, the selective behaviour of some species has been acknowledged. For instance, in a study conducted in Belém (Pará, Brazil), *Lutzomyia flaviscutellata* was the predominant species reported to bite rodents [3]. Nonetheless, most sand fly species for which information is available appear to be generalists rather than specialists in their host range [4-8]. This is the case of *Lutzomyia longipalpis*, the most important vector of *Leishmania infantum* in the Americas [9], making the host choice a matter of availability rather than preference. Understanding the blood-feeding patterns of these insects is of great ecological and epidemiological relevance, as it may provide data on host use and on potential reservoirs of *Leishmania* spp. [10].

* Correspondence: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

¹Department of Immunology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco 50740-465, Brazil

²Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Bari, Valenzano, Bari 70010, Italy



Different methods have been traditionally applied to study the blood-feeding behaviour of sand flies, including the precipitin test [4,7,11-13] and ELISA [14-16]. However, these methods present some technical limitations (e.g., the possibility of cross-reactivity between species, the need for producing specific antibodies to several species, and the inability to discover unpredicted hosts) ([10]; and references cited therein).

In light of these limitations, molecular methods have been developed for arthropod blood meal identification, including DNA sequencing, group-specific polymerase chain reaction primers, restriction fragment length polymorphism, real-time polymerase chain reaction, heteroduplex analysis, reverse line-blot hybridization and DNA profiling (reviewed in [17]). Incidentally, several genetic markers have been employed including mitochondrial genes (e.g., cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase subunit I genes), ribosomal RNA genes (e.g., 12S and 16S rDNA) and a nuclear gene (e.g., *prepronociceptin* gene) [17].

In the present study, we developed six uniplex SYBR Green-based real time PCR assays for sand fly blood meal identification using cytochrome *b* as a genetic target. These assays enable the detection of small quantities of the host DNA and represent new tools for the study of vector-host interactions.

Methods

Blood samples and sand flies

Blood samples from potential sand fly blood sources (i.e., dog, cat, horse, chicken, black rat, and human) were used as standard DNA. Moreover, a group of female sand flies were experimentally fed on a black rat (*Rattus rattus*) and used for evaluating the detection capacity of the assay targeting this species in function of time (see below).

Out of 24,226 sand flies collected in the framework of a previous study [18], 100 engorged females (92 *L. longipalpis*, seven *Lutzomyia migonei* and one *Lutzomyia lenti*) were used as field samples. In brief, these females were collected from August 2009 to August 2010, using standard CDC light traps in chicken coops, corrals and other animal sheds near human houses in the municipality of Passira (07°59'42" S, 35°34'51" O), Pernambuco, northeastern Brazil [18]. In the laboratory, these females were dissected and both head and the last three abdominal segments were used for species identification [19]. The thorax and remaining part of the abdomen of each female were transferred to a 1.5 ml tube and stored at -20°C for molecular processing.

DNA extraction and quality assessment

Genomic DNA was extracted from female sand flies and animal blood using DNeasy Blood & Tissue kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), respectively. Purified DNA samples were eluted in 100 µl of Tris-

EDTA buffer and frozen at -80°C. The quantity and degree of purity of the DNA samples was assessed using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific).

Primer designing and real time PCR conditions

Primers targeting each host species (i.e., dog, cat, horse, chicken, black rat, and human) were designed based on cytochrome *b* gene sequences available in GenBank (Table 1), using Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), considering the following criteria: expected PCR product size (70–120 base pairs) and primer melting temperatures (57–63°C).

DNA-free water was used as no template control (NTC) and unengorged females as negative control. The uniplex real time PCR reactions were run in an ABI PRISM 7000* (Applied Biosystems) and the results analyzed using 7500 software v2.3 (Applied Biosystems). Initially, each reaction consisted of a final volume of 50 µl containing 21 µl of type 1 water, 1 µl of each primer (5 pmol), 25 µl of SYBR Green-PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 2 µl of DNA template. Some reactions were also done in a final volume of 25 µl (i.e., 8.5 µl of type 1 water, 1 µl of each primer (5 pmol), 12.5 µl of SYBR Green-PCR Master Mix and 2 µl of DNA template), with no differences in terms of efficiency (data not shown). PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. All samples were tested in duplicate. The cutoff point was defined as the Ct value that corresponds to the defined lower limit of detection of the assay and, any Ct value above this limit, was considered negative.

Efficiency, specificity, detection limit and time course detection

The amplification efficiency (ϵ) was calculated using the equation: $\epsilon = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ [20]. In the same way, the specificity (σ) of the assays was determined by using primers for one animal species (target) and DNA from another animal species (templates), being calculated using the equation: $\sigma = (1 + \epsilon)^{\Delta C_t}$; where ΔC_t is the difference in the Ct values of the defined target and the templates. Melt curve was also considered in the specificity analysis. The detection limit of the assays was assessed using 10-fold serial dilutions (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, and 1 fg per 2 µl) of genomic DNA from each animal species. Finally, time course experiments were carried out to determine how long the host DNA could remain detectable by real time PCR. In particular, sand flies ($n = 50$) fed on a black rat were kept in the laboratory for different periods of time (i.e., 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, and 142 h) after the blood meal ingestion. At each time point five female sand flies were taken and subjected to DNA extraction or kept at -20°C until processing.

Table 1 Primers targeting host cytochrome b gene

Host species	Primers	CG content	Tm (°C)	Product size (bp)
<i>Canis lupus familiaris</i>	f5' - AGCGCCGCTAACATCTCTG - 3'	55.45	55.90	118
	r5' - TGTGGCTGTGTCGATGAT - 3'	50.89	59.10	
<i>Equus caballus</i>	f5' - CAGCCAGTGGAACACCCATA - 3'	55.00	59.67	103
	r5' - TGTTTCGATGGTGCTGCG - 3'	50.00	60.04	
<i>Felis catus</i>	f5' - AGAATGGATCTGAGGGGGCT - 3'	55.00	60.03	108
	r5' - AGGTGACTGCTGCTAAGGC - 3'	55.00	59.75	
<i>Gallus gallus</i>	f5' - CAGCAGACACATCCCTAGCC - 3'	60.00	60.18	104
	r5' - GAAGAATGAGGGCCGTTTG - 3'	55.00	60.18	
<i>Homo sapiens</i>	f5' - AGGCGCTCTGCCCTATTAC - 3'	55.00	59.53	104
	r5' - GTGATTGGCTTAGTGGGCG - 3'	55.00	60.39	
<i>Rattus rattus</i>	f5' - GAATTGGGGGCAACAGTA - 3'	55.00	59.00	109
	r5' - TCAATGATTCCGGAGATTGGT - 3'	42.86	57.00	

CG content: guanine-cytosine content; Tm: melting temperature.

DNA sequencing and analysis

PCR products were purified using Pure Link PCR Purification (Invitrogen), sequenced using a Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing and analyzed ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences generated were compared with known sequences available in the National Center for Biotechnology Information GenBank by using the Basic Local Alignment Search Tool algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Ethical considerations

All the procedures adopted in this study were approved by the human and animal ethics committees of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation,

Recife, Pernambuco, Brazil (CPqAM: CEP 14/13 and CEUA 55/2013).

Results

Each real time PCR protocol amplified successfully the DNA of the target animal species (Figure 1). No amplification was obtained with NTC or with negative controls (unengorged females). Non-specific amplification occurred in some cases: the primers targeting chickens amplified human (Ct 36.2–37.9) and black rat (Ct 37.6); the primers targeting cats amplified horse (Ct 37.2–38.6), dog (Ct 35.9–38.2), black rat (Ct 38.0–38.2), chicken (Ct 34.8–35.2) and human (Ct 34.4–34.7) DNA; and the primers targeting humans amplified dog (37.1),

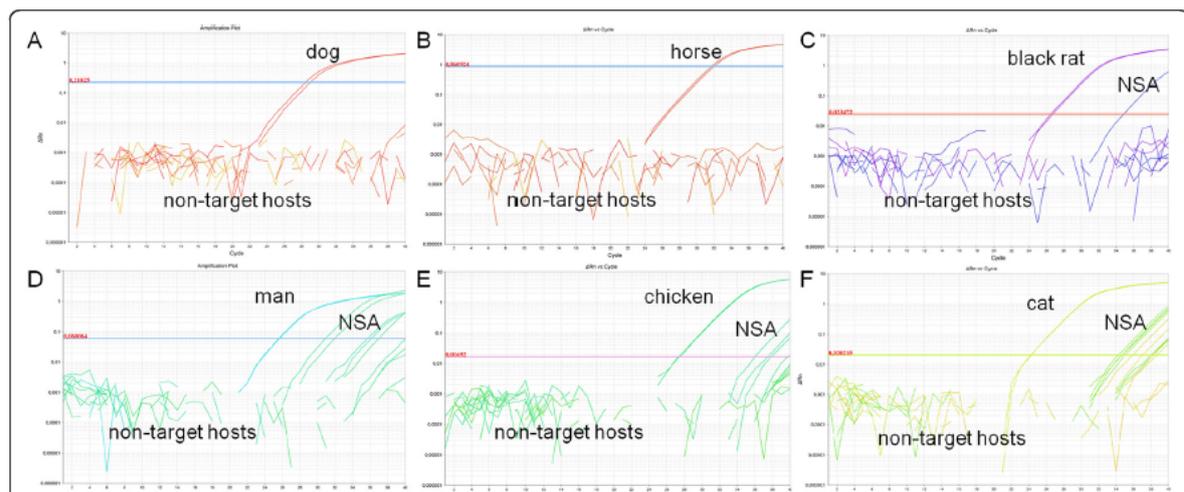


Figure 1 Specificity of the protocols. Specificity assays for each real time PCR protocol targeting different animal species: **A**, dog; **B**, horse; **C**, black rat; **D**, man; **E**, chicken; **F**, cat. Non-specific amplifications (NSA) were determined by melt curve analysis and/or cutoff Ct value (for more details, see text).

Table 2 Efficiency and detection limit

Target host	Slope	R ²	ε (%)	Detection limit (per 2 μl)
Dog	-3.58 ± 0.69	0.93 ± 0.10	96.3 ± 30.8	1 pg
Horse	-3.88 ± 0.61	0.96 ± 0.02	83.28 ± 14.74	10 pg
Cat	-3.37 ± 0.16	0.93 ± 0.02	96.89 ± 4.13	1 pg
Black rat	-4.29 ± 0.16	0.94 ± 0.04	71.06 ± 3.32	1 pg
Chicken	-3.65 ± 0.65	0.96 ± 0.06	92.61 ± 27.24	10 pg
Man	-3.84 ± 0.53	0.83 ± 0.23	84.17 ± 15.74	100 fg

Slope, R², amplification efficiency, and detection limit of the assays.

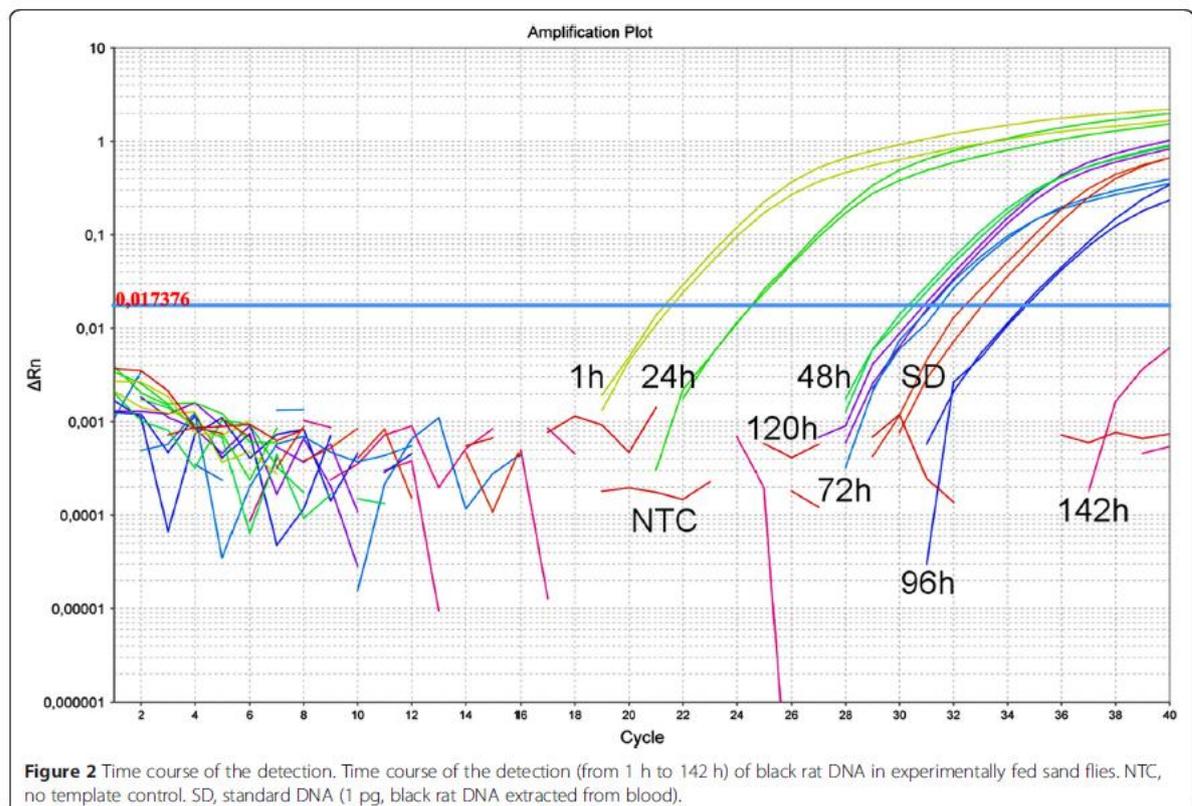
cat (Ct 31.0–32.0), and black rat (Ct 35.7–36.1). However, the non-specific amplifications above occurred usually in later cycles and could be distinguished by the Ct value (above defined lower limit of detection of each corresponding assay) and/or by melt curve analysis (as compared to the standard). Moreover, the specificity of the assays was also confirmed by DNA sequence analysis, which showed high levels of sequence identity (96–100%) with corresponding sequences available in GenBank (accession number: KJ185407.1, KF282339.1, KF964328.1, AB194817.1, KF038166.1, and KJ522809.1).

The detection limit of the assays ranged from 10 pg to 100 fg, with an acceptable level of homogeneity among replicates and reaction efficiency (Table 2). Remarkably,

time course experiments showed that the real time PCR assay targeting black rat DNA was capable of detecting small amounts of the host DNA (~1 pg) up to 120 h after the blood feeding (Figure 2).

Among field-collected engorged female sand flies, 91% were positive and 9% negative for any host DNA. In particular, 73% of them were fed on humans, 23% on chickens, 22% on dogs, 15% on horses, 11% on black rats and 2% on cats. Interestingly, most *L. longipalpis* females were fed on humans (76.1%), followed by chickens (19.6%), dogs (16.3%), horses (16.3%), black rats (12%) and cats (2.2%).

In total, 48% of the field-collected female sand flies were positive for one animal species, 31% for two and 12% for three. Among females that were fed on one source, the



majority contained human blood (73%), followed by chicken (10.4%) and dog blood (6.2%). Among those fed on two sources, most of them were positive for human + horse (7), human + chicken (7), human + dog (8) and human + rat (4). Finally, most females fed on three sources were positive for human + dog + chicken (5), followed by human + horse + rat (3), human + dog + cat (1), human + horse + chicken (1), and human + chicken + rat (1).

Discussion

In the present study we developed SYBR Green-based real time PCR assays for the identification of female sand fly blood meals. Remarkably, the assays were capable of detecting small amounts of host DNA in field-collected engorged females stored at -20°C for ~4 years. The good performance of the assays developed herein allowed the detection of as little as 100 fg per reaction mixture (i.e., 2 µl) of the host DNA (i.e., human). Indeed, the detection limit of our assays is fairly equivalent to that reported by some authors (10 pg in Ref. [10]; 1 pg in Ref. [21]), confirming the usefulness of the cytochrome *b* gene as a genetic target for blood meal identification in sand flies, as previously demonstrated with conventional PCR protocols [21-24].

Several methodologies have been used to detect the blood meal in arthropod vectors, such as mosquitoes [17], but there are some biological differences that make it difficult to extrapolate the results for sand flies, including the lower amount of blood imbibed by sand flies (1 µl or less) [25] than mosquitoes (2–6 µl) [26]. Additionally, the blood digestion in haematophagous insects may result in DNA denaturation, therefore impairing the detection of the host DNA some days after the blood meal [27,28]. It is thus desirable to have a technique that is sensitive enough to allow the detection of minimal amounts of DNA, even some days after the ingestion of the blood. Indeed, it is difficult to estimate the time elapsed since the last blood meal, particularly in field-collected female sand flies with no visible blood in the abdomen. The results of time course experiments obtained herein demonstrated that the protocol targeting black rats allowed the detection of the host DNA up to 5 days after the blood feeding. This is consistent with other published assays for mosquito and sand fly blood meal identification, which generally were able to detect the host DNA for up to 1–4 days [10,21,22,27-29]. Interestingly, a PCR heteroduplex assay was developed to identify avian derived mosquito blood meals, being capable of detecting the host DNA for up to 7 days [30]. The authors suggested that the greater amount of host DNA in the avian blood meal persists for a longer period than in a mammalian blood meal.

The catholic feeding behavior of *L. longipalpis* is well acknowledged [9]. Accordingly, most females belonging

to this species analyzed in the current study were positive for humans, followed by chickens, dogs, horses, black rats and cats. Interestingly enough, most field-collected *L. longipalpis* females were trapped in chicken coops near human houses, being 19.2% of the human blood-positive females also positive for chicken blood. This data may suggest that the establishment of chicken coops near human houses may increase the risk of exposure to sand flies. Certainly, studying the blood feeding behaviour of sand fly vectors may help in understanding host-vector interactions and possibly the transmission dynamics of *Leishmania* parasites [31,32].

Conclusions

In conclusion, the SYBR Green-based real time PCR assays standardized herein represent promising tools for blood meal identification in field-collected sand flies. Indeed, these assays successfully detected small amounts of host DNA in female sand flies fed on different vertebrate species and, specifically for black rats, up to 5 days after the blood meal. As a perspective, it would be valuable to increase the efficiency of these assays for blood meal quantification purposes. Finally, from a cost-benefit perspective, a multiplex real time PCR assay should be standardized for the simultaneous detection of blood meals from different hosts in sand flies as well in other blood feeding arthropods. In this perspective, the use of TaqMan probes and, perhaps, designing new primers (e.g., for cats and humans) would be more appropriate to increase the specificity of the assay.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: KGSS, MPC and FDT. Performed the experiments: KGSS and RSCM. Contributed to sample collection: KGSS and PLC. Contributed to data interpretation: MPC, DO, SPBF and FDT. Wrote the paper: KGSS and FDT. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

Thanks to Maria Stefania Latrofa for her assistance with sequence editing and analysis and to Fernando José da Silva for his assistance with the sand flies. The first author (KGSS) received a Master's scholarship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Thanks to Vice-Presidency of Education, Information and Communication (VPEIC) of Fiocruz for supporting this publication.

Received: 18 August 2014 Accepted: 3 April 2015

Published online: 16 April 2015

References

1. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27:127-47.
2. Ready PD. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 1979;16:413-23.
3. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower Amazon region—the feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1968;62:396-405.

4. Guy MW, Killick-Kendrick R, Gill GS, Rioux JA, Bray RS. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1984;59:449–58.
5. Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kilu G, Asiago C. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo District, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Vet Entomol*. 1992;6:385–8.
6. Oliveira-Pereira YN, Moraes JL, Lorosa ES, Rebêlo JM. Feeding preference of sand flies in the Amazon, Maranhão State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24:2183–6.
7. Baum M, Ribeiro MC, Lorosa ES, Damasio GA, Castro EA. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:560–5.
8. Macedo-Silva VP, Martins DR, De Queiroz PV, Pinheiro MP, Freire CC, Queiroz JW, et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol*. 2014;51:237–344.
9. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:811–27.
10. Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. Development of a molecular tool for a identification of *Leishmania* reservoir host by blood meal analysis in the vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:1054–9.
11. Nery LC, Lorosa NE, Franco AM. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:571–4.
12. Afonso MM, Gomes AC, Meneses CR, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005;21:1816–20.
13. Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevêdo PC, Lopes GN, Moraes JL, Lorosa ES, et al. Blood feeding preference of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) in a transmission area for American cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:647–50.
14. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. Seasonal phenology, host–blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop*. 2008;105:158–65.
15. Afonso MM, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med*. 2012;2012:858657.
16. Marassá AM, Galati EA, Bergamaschi DP, Consales CA. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:547–54.
17. Kent RJ. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol Ecol Resour*. 2009;9:4–18.
18. Costa PL, Dantas-Torres F, da Silva FJ, Guimarães VC, Gaudêncio K, Brandão-Filho SP. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Trop*. 2013;126:99–102.
19. Young GD, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst*. 1994;54:1–881.
20. Too HP. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;114:146–54.
21. Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009;9:79–86.
22. Garlapati RB, Abbasi I, Warburg A, Poché D, Poché R. Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *J Med Entomol*. 2012;49:515–21.
23. Tiwananthogorn S, Bhutto AM, Baloch JH, Soomro FR, Kawamura Y, Nakao R, et al. Zoophilic feeding behaviour of phlebotomine sand flies in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis of Sindh Province, Pakistan. *Parasitol Res*. 2012;111:125–33.
24. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*. 2013;112:2453–9.
25. Daba S, Daba A, Shehata MG, El Sawaf BM. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol*. 2004;34:173–82.
26. Clements AN. The biology of mosquitoes: development structure and reproduction. 1st ed. London: Chapman & Hall; 1992.
27. Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:336–42.
28. Sant'Anna MR, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop*. 2008;107:230–7.
29. Valinsky L, Ettinger G, Bar-Gal GK, Orshan L. Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. *J Med Entomol*. 2014;51:678–85.
30. Lee JH, Hassan H, Hill G, Cupp EW, Higazi TB, Mitchell CJ, et al. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction heteroduplex analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:599–604.
31. Es-Sette N, Ajaoud M, Laamrani-Idrissi A, Mellouki F, Lemrani M. Molecular detection and identification of *Leishmania* infection in naturally infected sand flies in a focus of cutaneous leishmaniasis in northern Morocco. *Parasit Vectors*. 2014;7:305.
32. Maia C, Parreira R, Cristóvão J, Freitas F, Afonso M, Campino L. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasit Vectors*. 2015;8:173.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Utilização de PCR em tempo real para caracterização das fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em regiões endêmicas para as leishmanioses no Estado de Pernambuco, Brasil**, protocolado sob nº 55/2013 pelo (a) pesquisador (a) Filipe Dantas Torres.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 27/02/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 31 de julho de 2015.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Gallus gallus	1
Canis lupus familiaris	1
Equus caballus	1
Felis catus	1
Rattus rattus	1
Sus scrofa domesticus	1

We certify that project entitled **Utilização de PCR em tempo real para caracterização das fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em regiões endêmicas para as leishmanioses no Estado de Pernambuco, Brasil**. Protocol nº 55/2013, coordinated by Filipe Dantas Torres. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on February, 27, 2014. In present version this project is licensed and valid until July, 31,2015.

Recife (PE, Brazil) February, 27, 2014.


 Dra. Laura Helena Vega Gonzalez
 Coordenadora CEUA/CPqAM

DRA. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais - CEUA
 CEPqAM/FIOCRUZ
 Tel: (81) 3453-1911
 www.ceua.fiocruz.br

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br

ANEXO B - CEP

Título do Projeto: “Investigação de causas nas mudanças das incidências da leishmaniose cutânea e mucocutânea humana em Pernambuco, Brasil”.

Pesquisador responsável: Sinval Brandão Filho.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 22/01/13

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 04/13

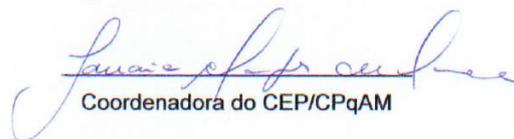
Registro no CAAE: 12131413.8.0000.5190

PARECER Nº 28/2013

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 17 de julho de 2016. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 17 de julho de 2013.



Coordenadora do CEP/CPqAM

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 17/07/2014.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO C - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-2	Data da Emissão: 13/12/2010 12:29
Dados do titular	
Nome: Sival Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colonização de <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Gale a spixii</i> e <i>Rattus rattus</i>	08/2007	08/2012
2	Colonização de <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	08/2007	08/2012
3	Realização de ensaios de infecciosidade	08/2007	08/2012
4	Coleta de pequenos roedores e flebotomíneos	02/2011	08/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que específica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Francisco Gomes de Carvalho	Biólogo responsável pela capturas	125.053.664-20	405657 SSP-CE	Brasileira
2	Gertane Tavares de Souza Chioratto	Médica Veterinária	027.420.304-92	4881818 SSP-PE	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO VICENTE FERRER	PE	Mundo Novo	Fora de UC
2	VICENCIA	PE	Imbu	Fora de UC
3	AMARAJI	PE	Refrigério	Fora de UC
4	PAUDALHO	PE	CIMNC	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 96617826



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-2	Data da Emissão: 13/12/2010 12:29
Dados do titular	
Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Lutzomyia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Rodentia (*Qtde: 10), Lutzomyia (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Lutzomyia
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Rodentia

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	criadouro científico
2	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Instituição de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 96617826



Página 2/3

